

P-glykoproteiinissa esiintyvä perinnöllinen muuntelu sekä
p-glykoproteiinin geneettisten varianttien ilmentäminen ja
tutkiminen HEK293-soluissa

Virpi Hurmalainen
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmaseuttisten biotieteiden osasto
Toukokuu 2021



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Farmasian tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Proviisorin koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Virpi Hurmalainen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title P-glykoproteiinissa esiintyvä perinnöllinen muuntelu sekä p-glykoproteiinin geneettisten varianttien ilmentäminen ja tutkiminen HEK293-soluissa			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Biofarmasia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Toukokuu 2021	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 73
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>P-glykoproteiini on ABC-kuljetinproteiineihin kuuluva effluksiproteiini, joka ilmenee erityisesti sellaisissa kudoksissa, jotka rajoittavat vierasaineiden imeytymistä ja jakautumista elimistöön, tai osallistuvat niiden eliminaatioon. P-glykoproteiinilla tiedetään olevan tärkeä rooli esimerkiksi veri-aivoesteen toiminnassa ja sikiön suojaamisessa vierasaineilta raskauden aikana.</p> <p>Perinnöllinen muuntelu kuljetinproteiinien geneeissä voi aiheuttaa yksilöiden välillä eroja lääkeaineiden farmakokinetiikassa, mikä voi johtaa yksilöllisiin eroihin lääkkeiden tehossa tai haittavaikutuksissa. P-glykoproteiinia koodaavassa <i>ABCB1</i>-geenissä esiintyy monia yhden nukleotidin polymorfismeja, joiden yleisyys eri etnisissä ryhmissä vaihtelee. Aiempien tutkimusten perusteella p-glykoproteiinin polymorfismien vaikutukset ovat usein substraalista riippuvaisia. Polymorfismien vaikutusten selvittämisessä <i>in vitro</i> -tutkimukset ovat tärkeitä, sillä kliinisissä tutkimuksissa on vaikeaa sulkea pois muita lääkeaineiden farmakokinetiikkaan vaikuttavia asioita. Polymorfismeja voidaan tutkia aiheuttamalla tutkittava mutaatio geeniin keinotekoisesti ja ilmentämällä varianttiproteiinia halutussa solulinjassa.</p> <p>Tässä tutkimuksessa valmistettiin kohdennetun mutageneesin avulla neljä p-glykoproteiinin varianttigeeniä (c.781A>G, c.1199G>T, c.2005C>T ja c.3421T>A) sekä ilmennettiin niitä bakulovirusavusteisen menetelmän avulla HEK293-soluissa. Polymorfismien vaikutuksia tutkittiin määrittämällä varianttiproteiinien ilmentymistaso Western blot -kokeen avulla, sekä tutkimalla varianttiproteiinien kuljetusaktiivisuutta kalseiininkertymiskokeen avulla. Lisäksi optimoitiin vesikkelikuljetuskoetta käyttäen n-metyylikinidiiniä substraattina, mutta varianttiproteiineja ei ehditty tutkimuksen aikana vertailla sen avulla.</p> <p>Tutkimuksessa ei havaittu kalseiininkertymiskokeissa tilastollisesti merkitseviä eroja tutkittavien neljän varianttiproteiinin kuljetusaktiivisuudessa verrattuna villityyppiin. Myöskin erot varianttiproteiinien ilmentymistasossa villityyppiin verrattuna olivat pieniä. On kuitenkin toivottavaa tutkia polymorfismien vaikutuksia p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuteen vähintään yhdellä muullakin substraattilla ja koeasetelmalla. Tämän takia varianttiproteiinien tutkimista kannattaa jatkaa vesikkelikuljetuskokeen avulla. Tutkimuksessa käytetyt koeasetelmat vaativat vielä lisää optimointia mm. hajonnan pienentämiseksi.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords P-glykoproteiini, MDR1, ABCB1, kuljetinproteiini, polymorfismi, geneettinen muuntelu, ilmentyminen, kuljetusaktiivisuus			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Noora Sjöstedt ja Heidi Kidron			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited e-thesis.helsinki.fi			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Pharmacy		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Master's Programme in Pharmacy	
Tekijä – Författare – Author Virpi Hurmalainen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Genetic polymorphisms of p-glycoprotein and the expression and investigation of p-glycoprotein genetic variants in HEK293 cells			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Biopharmacy			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis		Aika – Datum – Month and year May 2021	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 73
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>P-glycoprotein is an efflux transporter of the ABC family. It is expressed mainly in tissues that have a role in limiting the absorption and distribution of xenobiotics in the body or their elimination. P-glycoprotein is known to have an important role for example in the blood-brain barrier and in protecting the fetus from xenobiotics in the mother's blood stream.</p> <p>Genetic polymorphisms in transporter proteins can cause individual differences in the pharmacokinetics of drug substances, which can lead to differences in drug efficacy or side effects. In the <i>ABCB1</i> gene, which codes for p-glycoprotein, several polymorphisms have been discovered. The frequencies of these polymorphisms vary in different ethnic populations. Previous studies have shown that the effects of these polymorphisms are often substrate-dependent. Since there are several confounding factors usually present in clinical association studies, <i>in vitro</i> studies are needed to clarify the effects of individual polymorphisms. Polymorphisms can be studied <i>in vitro</i> by making intentional mutations to the gene sequence and expressing the variant gene in a suitable cell line.</p> <p>In this study four variant p-glycoprotein genes (c.781A>G, c.1199G>T, c.2005C>T and c.3421T>A) were created by site-directed mutagenesis, and expressed in HEK293 cells using a baculovirus recombinant protein expression method. The effects of the polymorphisms were studied by determining the expression level and the transport activity of the variant proteins compared to the wild-type. Western blot was used to determine the expression level and a calcein accumulation assay in HEK293 cells was used to compare the transport activities. Also a membrane vesicle transport assay with n-methyl quinidine was set up and optimized, but the variants were not yet studied with this method during this study.</p> <p>In this study no statistically significant differences were found in the transport activities of any of the four variants compared to the wild-type p-glycoprotein. Also the differences in protein expression level between wild-type and variant proteins were small. However, because of the previously reported substrate dependency of polymorphism effects, it would be beneficial to study the variants with at least one other substrate and one other assay method, and thus the membrane vesicle transport assay would be useful to further compare the transport activities of variant proteins to the wild-type p-glycoprotein.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords P-glycoprotein, MDR1, ABCB1, transporter protein, genetic polymorphism, expression, transport activity			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Noora Sjöstedt and Heidi Kidron			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited e-thesis.helsinki.fi			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS. P-GLYKOPROTEIININ PERINNÖLLINEN MUUNTELU	1
1 JOHDANTO	1
2 P-GLYKOPROTEIININ FYSIOLOGINEN JA FARMAKOKINEETTINEN MERKITYS.....	2
2.1 Ilmentyminen kehossa	2
2.2 Ilmentyminen kasvainkudoksissa ja -solulinjoissa	3
2.3 Merkitys lääkeaineiden farmakokinetiikassa	4
2.4 P-glykoproteiinin kautta välittyvät lääkeaineiden yhteisvaikutukset	5
3 P-GLYKOPROTEIININ RAKENNE JA TOIMINTA.....	7
3.1 Substraatit.....	7
3.2 Rakenne ja toimintamekanismi.....	8
4 P-GLYKOPROTEIINISSA ESIINTYVÄ PERINNÖLLINEN MUUNTELU	11
4.1 Perinnöllisen muuntelun esiintyvyys p-glykoproteiinissa	11
4.2 Polymorfismien aiheuttamat molekyyli-tason vaikutukset	14
4.3 Polymorfismien sijainti proteiinissa	14
4.4 Tutkimusnäyttö eri polymorfismien vaikutuksista.....	15
4.4.1 Polymorfismi c.3435C>T.....	16
4.4.2 Polymorfismit c.2677G>T ja c.2677G>A.....	18
4.4.3 Polymorfismi c.1236C>T.....	19
4.4.4 Polymorfismien c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T muodostamat haplotyytit	20
4.4.5 Polymorfismit c.1199G>A ja c.1199G>T.....	23
4.4.6 Polymorfismi c.3421T>A	24
4.4.7 Polymorfismi c.61A>G.....	24
4.4.8 Polymorfismi c.3751G>A.....	25
4.4.9 Polymorfismi c.781A>G.....	25
4.4.10 Polymorfismi c.2005C>T.....	26
4.5 Polymorfismien merkitys sairauksien synnyssä	26
4.5.1 Alzheimerin tauti.....	27
4.5.2 Parkinsonin tauti	28
4.5.3 Suolistosairaudet.....	29
4.6 P-glykoproteiinin perinnöllisen muuntelun kliininen merkitys.....	29
OSA II: KOKEELLINEN TUTKIMUS.....	33

5	TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET	33
6	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	37
6.1	Yleisimpien haplotyyppien ja p-glykoproteiinivarianttien mutageneesi pENTR-kantajaplasmidissa	37
6.2	Soluviljely	40
6.3	P-glykoproteiinibakulovirusten tuottaminen Sf9-soluissa	40
6.4	Vesikkelien valmistaminen <i>ABCB1</i> -transdusoiduista HEK293-soluista	44
6.5	Vesikkelikuljetuskoe p-glykoproteiiniaktiivisuuden määrittämiseksi	44
6.6	Ilmentymistason määrittäminen Western blot -kokeen avulla	46
6.7	P-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuden tutkiminen kalseiininkertymiskokeella	48
7	TULOKSET	50
7.1	<i>ABCB1</i> -geenikonstruktit ja p-glykoproteiinin ilmentäminen bakulovirusransduktion avulla	50
7.2	Virusmäärän ja transduktio-olosuhteiden vaikutus p-glykoproteiinin ilmentymiseen	51
7.3	Varianttien ilmentyminen ja aktiivisuus verrattuna villityyppeihin	54
8	POHDINTA	57
9	JOHTOPÄÄTÖKSET	62
	LÄHDELUETTELO	64

OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS. P-GLYKOPROTEIININ PERINNÖLLINEN MUUNTELU

1 JOHDANTO

On jo pitkään tiedetty, että yksilöiden välillä esiintyy eroja lääkevasteessa, kuten lääkityksen tehossa tai sen aiheuttamissa haittavaikutuksissa. Tähän asiaan vaikuttavat monet seikat, kuten ikä, sairaudet ja muut lääkitykset. On kuitenkin arvioitu, että jopa 97 % ihmisistä kantaa vähintään yhtä geenivarianttia, jolla on potentiaalista merkitystä lääkevasteen kannalta (Wright ym. 2018). Farmakogeneettisen tutkimuksen osalta mielenkiinto kohdistui aluksi enimmäkseen metaboliaentsyymeihin, mutta viime vuosikymmeninä on yhä paremmin ymmärretty solumembraaneilla ilmentyvien lääkekuljetinproteiinien merkitys lääkevasteessa, ja samalla myös farmakogeneettinen tutkimus on painottunut yhä enemmän lääkekuljetinproteiinien geeneissä esiintyvään yksilölliseen vaihteluun (Yee ym. 2018). Sen lisäksi, että lääkekuljetinproteiinit ovat avainasemassa monien lääkkeiden imeytymisessä, jakautumisessa ja eliminaatiossa, niillä on monissa tapauksissa myös suora vaikutus lääkkeen pääsemisessä itse vaikutuspaikkaansa (Lai ym. 2012). Genominlaajuisten tutkimusmenetelmien kehittäminen on johtanut siihen, että lääkekuljetinproteiinien geeneissä on tunnistettu lukuisia polymorfismeja, jotka vaikuttavat merkittävästi yksilöiden väliseen vaihteluun lääkeaineiden farmakokinetiikassa, lääkevasteessa tai lääkkeen aiheuttamassa toksisuudessa (Yee ym. 2018).

ABC-kuljetinproteiinit (ATP-binding cassette transporter) muodostavat kaikkein laajimman lääkekuljetinproteiinisuperperheen esiintyen koko eliökunnassa (El-Awady ym. 2017). Eukaryooteissa esiintyvät ABC-proteiinit ovat effluksiproteiineja, eli ne kuljettavat substraattejaan ulos solusta. Yksi eniten tutkituista nisäkkäiden ABC-proteiineista on p-glykoproteiini. P-glykoproteiinilla tiedetään olevan tärkeä rooli esimerkiksi lääkeaineiden keskushermostokulkeutumisen rajoittamisessa sekä syöpälääkeresistenssin syntymisessä (Yee ym. 2018). P-glykoproteiinin merkittävytydestä lääkeaineiden farmakokinetiikassa kertoo esimerkiksi se, että sekä Euroopan unionin että Yhdysvaltojen lääkeviranomaiset suosittelevat lääkeyrityksiä

uusien lääkeaineiden osalta tutkimaan, ovatko ne p-glykoproteiinin substraatteja tai inhibiittoreita (EMA 2012, FDA 2020). P-glykoproteiinin geenissä (*ABCB1*) on havaittu esiintyvän perinnöllistä muuntelua eli geneettistä polymorfismia useissa eri kohdissa, sekä koodaavilla että ei-koodaavilla alueilla, kuten säätelyalueilla (Wolking ym. 2015). Tähän muunteluun onkin kohdistunut tieteellistä mielenkiintoa jo yli kahden vuosikymmenen ajan siksi, että teoriassa polymorfismi p-glykoproteiinin geenissä voisi aiheuttaa yksilöiden välisiä eroja lääkeaineiden farmakokinetiikassa ja hoitovasteessa, joko proteiinin ilmentymistason tai kuljetusaktiivisuuden muutoksien kautta. Parhaimmillaan lisätieto aiheesta voisi auttaa kehittämään yksilöllistettyjä lääkehoitoja esimerkiksi rintasyöpään, leukemioihin tai lääkeresistenttiin epilepsiaan, lisäten lääkehoitojen tehoa ja vähentäen haittavaikutuksia (Tulsyan ym. 2016, Ankathil 2017, Orsini ym. 2018). P-glykoproteiinin perinnöllisen muuntelun ja sen kliinisen merkittävyyden suhteen on kuitenkin vielä monia avoimia kysymyksiä, sillä tutkimustulokset ovat olleet osittain ristiriitaisia ja vaikeita tulkita (Yee ym. 2018). Tässä kirjallisuuskatsauksessa syvennytään siihen, mitä p-glykoproteiinin polymorfismeista ja niiden vaikutuksista tällä hetkellä tiedetään.

2 P-GLYKOPROTEIININ FYSIOLOGINEN JA FARMAKOKINEETTINEN MERKITYS

2.1 Ilmentyminen kehossa

P-glykoproteiini ilmentyy monissa eri kudoksissa ihmisen kehossa. Erityisesti sen tiedetään ilmentyvän polarisoituneella tavalla niin kutsutuissa suojamuurikudoksissa, eli sellaisten solujen apikaalimembraanilla, jotka ovat imeytymistä rajoittavien tai erittävien onteloiden rajapinnalla (Thiebaut ym. 1987). Proteiinin sijainti kertooakin proteiinin tehtävästä kehossa, sillä tällaisilla rajapinnoilla ilmentyessään p-glykoproteiini rajoittaa vierasaineiden imeytymistä kehoon tai kudokseen, tai edesauttaa niiden pumppaamista ulos kehosta tai kudoksesta. Tällainen p-glykoproteiinin polarisoitunut ilmentyminen

solujen apikaalipuolella on havaittu esimerkiksi maksan sappitiehyissä, paksusuolen ja ohutsuolen epiteelillä, munuaisessa proksimaalisten kiemuratiehyiden epiteelillä, sekä haiman pienissä tiehyissä. Aivojen kapillaariverisuonten endoteelisoluissa p-glykoproteiini ilmentyy solujen luminaalisella puolella, eli kapillaarisuonissa kulkevan veren ja endoteelisolun rajapinnassa (Sugawara ym. 1990). P-glykoproteiinin on todettu ilmentyvän myös istukassa trofoblasteissa, jotka ovat suorassa kontaktissa äidin verenkierron kanssa, näin mahdollistaen sikiön suojaamisen äidin verenkierron vierasaineilta (Nakamura ym. 1997). Kiveksissä puolestaan p-glykoproteiini ilmentyy Sertolin soluissa, missä sillä ajatellaan olevan tärkeä rooli veri-kiveseseen toiminnassa ja siten kehittyvien siittiöiden suojelemisessa vierasaineilta (Su ym. 2012).

2.2 Ilmentyminen kasvainkudoksissa ja -solulinjoissa

P-glykoproteiini löydettiin 1970-luvulla tutkijoiden pyrkiessä selvittämään, mikä aiheutti kiinalaisen hamsterin munasolujen mutanttisolulinjassa vastustuskyvyn useille amfiifiilisille lääkeaineille (Juliano ja Ling 1976). Resistenssin havaittiin liittyvän 170 kDa:n kokoiseen glykoproteiiniin, joka ilmentyi lääkeresistenttien solujen solumembraanilla. Koska glykoproteiini aiheutti muutoksen solukalvon permeabiliteetissa, tutkijat alkoivat kutsua sitä nimellä p-glykoproteiini. Tämän nimityksen lisäksi p-glykoproteiinia kutsutaan nykyisin myös monilääkeresistenssiä aiheuttavaa ominaisuutta korostavalla nimellä MDR1 (multi-drug resistance protein 1), sekä nimellä ABCB1 (ATP-binding cassette transporter B1), mikä puolestaan korostaa sitä seikkaa, että p-glykoproteiini on osa laajempaa ATP:tä sitovaa kasettitransporteriperhettä (Wolking ym. 2015).

P-glykoproteiinin oletettu merkitys monilääkeresistenssin syntymisessä sai lisää vahvistusta, kun p-glykoproteiinia koodaavan geenin havaittiin olevan monistunut monilääkeresistenteissä kiinanhamsterin munasoluissa, ja monistumisen asteen havaittiin korreloivan monilääkeresistenssin voimakkuusasteen kanssa (Riordan ym. 1985). P-glykoproteiinin ilmentymisen onkin osoitettu olevan voimakasta useissa erilaisissa kasvainkudoksissa, ja sen ilmentymisen on havaittu voimistuvan sytostaattikäsittelystä tuumorikudoksessa, jossa lääkeresistenssi on kehittymässä (Fojo ym. 1987). P-

glykoproteiinivälitteisen lääkeresistenssin syntyprosessiin solulinjoissa on havaittu liittyvän sekä transkription voimistumista että geenin monistumista (Shen ym. 1986).

2.3 Merkitys lääkeaineiden farmakokinetiikassa

P-glykoproteiinin merkitys keskushermoston veriaivoesteessä havaittiin 1990-luvulla tutkittaessa hiiriä, joilta oli poistettu p-glykoproteiinia hiirissä koodaava *mdr1a*-geeni (Schinkel ym. 1994). Pienet annokset ivermektiiniä eivät aiheuttaneet villityypin hiirille mitään oireita, mutta aiheuttivat *mdr1a*(-/-)-hiirissä kuoleman, ja *mdr1a*(-/-)-hiirten havaittiin olevan 50–100-kertaisesti herkempiä ivermektiinin haittavaikutuksille. Tutkittaessa tarkemmin ivermektiinin jakautumista näissä hiiriryhmissä, havaittiin että ivermektiinipitoisuus poikkesi villityypin ja *mdr1a*(-/-)-hiirten välillä erityisesti keskushermostossa, pitoisuuden ollessa *mdr1a*(-/-)-hiirten aivoissa keskimäärin 90-kertainen verrattuna villityyppiin, kun taas plasmapitoisuudessa ja muissa kudoksissa muutos oli maltillisempi plasmapitoisuuden ollessa noin 3–4-kertainen *mdr1a*(-/-)-hiirissä verrattuna villityyppiin.

Samankaltaisia tuloksia keskushermoston lääkeainepitoisuuksista verrattuna plasman lääkeainepitoisuuksiin saatiin myöhemmin myös muilla lääkeaineilla, kuten vinblastiinilla, digoksiinilla ja syklosporiini A:lla, ja p-glykoproteiinilla todettiin lisäksi olevan merkittävä rooli substraattinsa eliminaatiossa (Schinkel ym. 1994 ja 1995). Veriaivoesteessä ilmentyvän p-glykoproteiinin onkin havaittu olevan merkittävä osaselittäjä sille, miksi osa lipofiilisistäkin lääkkeistä ei pysty juuri ollenkaan kulkeutumaan keskushermostoon, vaikka lääkkeiden fysikaaliskemialliset ominaisuudet antaisivat syytä näin olettaa (Miller ym. 2008). P-glykoproteiinin rooli keskushermostossa lääkehoidon kannalta onkin kahtalainen: toisaalta p-glykoproteiini suojelee keskushermostoa monien lääkeaineiden haittavaikutuksilta, toisaalta taas se on usein esteenä lääkkeiden kohdentamisessa keskushermostoon.

P-glykoproteiinin merkitys oraalisesti annostellun lääkeaineen biologiseen hyötyosuuteen havaittiin myös *mdr1a*(-/-)-hiiriä käyttämällä (Sparreboom ym. 1997). Paklitakselin biologinen hyötyosuus yli kolminkertaistui *mdr1a*(-/-)-hiirissä verrattuna villityypin hiiriin. Lisäksi tutkijat osoittivat, että p-glykoproteiini ei ainoastaan

vähentänyt oraalisesti annostellun lääkkeen imeytymistä ruuansulatuskanavasta verenkiertoon, vaan myös aktiivisesti eritti suonensisäisesti annosteltua lääkeainetta ruuansulatuskanavaan. Sittenkin onkin käynyt selväksi, että p-glykoproteiinivälitteinen aktiivinen kuljetus on tärkeä osatekijä monien lääkeaineiden huonossa oraalisessa imeytymisessä ja biologisessa hyötyosuudessa (Anwar ja Ayman 2012).

Koska p-glykoproteiini ilmentyy maksassa ja munuaisissa, p-glykoproteiini voi vaikuttaa myös substraattinsa eliminaatioon (Matheny ym. 2001). P-glykoproteiini sijaitsee sappitiehyen apikaalimembraanilla erittäen substraattejaan sappeen, mikä on monilla lääkeaineilla tärkeä eliminaatioreitti, joko muuttumattomana tai metaboloituneena. Esimerkiksi doksorubisiinin erittyminen sappeen oli 82 % vähäisempää *mdr1a*(-/-)-hiirissä verrattuna villityypin hiiriin (Van Asperen ym. 2000). Munuaisissa proksimaalisten kiemuratiehyiden membraanisolujen apikaalipuolella sijaitseva p-glykoproteiini erittää aktiivisesti substraattejaan virtsaan sekä rajoittaa suodattuneiden substraattien uudelleenimeytymistä (Matheny ym. 2001). Esimerkiksi pääasiassa munuaisten kautta poistuvan p-glykoproteiinisubstraatti digoksiinin eliminoitumisen munuaisissa on osoitettu vähenevän, jos digoksiinia annostellaan yhdessä p-glykoproteiini-inhibiittoreiden kanssa.

P-glykoproteiinilla on osoitettu olevan tärkeä merkitys myös sikiön suojelemisessa teratogeeneilta raskauden aikana. Lankas (1998) kollegoineen tutki teratogeeniseksi tunnettua lääkeainetta L-652,280 hiirikannassa, jossa tapahtunut spontaani mutaatio aiheutti hiirikantaan p-glykoproteiinin puutoksen. Kun emot altistettiin lääkeaineelle tiineyden aikana, mutaation suhteen homotsygooteista sikiöistä 100 %:lla havaittiin suulakihalkio, heterotsygooteista noin 30 %:lla, ja villityypin suhteen homotsygooteilla taas ei havaittu ollenkaan suulakihalkiota.

2.4 P-glykoproteiinin kautta välittyvät lääkeaineiden yhteisvaikutukset

P-glykoproteiinin kautta välittyy monia lääkeaineiden välisiä farmakokineettisiä yhteisvaikutuksia, ja näiden merkitystä korostaa se, että p-glykoproteiinin substraattikirjo on varsin laaja (luku 3.1). P-glykoproteiinin toiminnan inhiboituminen toisen lääkeaineen vaikutuksesta voi olla seurausta kilpailevasta sitoutumisesta substraatin sitomiskohtaan,

tai ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) hydrolyysin hidastumisesta (Anwar ja Ayman 2012). P-glykoproteiinin inhiboituminen johtaa yleensä lääkeaineen lisääntyneeseen hyötyosuuteen ja/tai pienentyneeseen puhdistumaan, näin vaikuttaen merkittävästi lääkeaineen kokonaisaltistukseen. Pääosin näiden yhteisvaikutusten kliininen merkitys kuitenkin jää melko pieneksi lukuunottamatta lääkeaineita, joilla on kapea terapeutinen leveys (Lai ym. 2012). Tunnetuin tällaisista yhteisvaikutuksista on kapean terapeutisen leveyden omaavan sydänlääkkeen digoksiinin pitoisuuden muuttuminen p-glykoproteiini-inhibiittoreiden läsnäollessa, mikä voi potentiaalisesti johtaa vakaviinkin haittoihin. Esimerkiksi samanaikaisesti käytetty verapamiili voi annoksesta riippuen suurentaa digoksiinin plasmapitoisuutta 40–80 %:lla vähentämällä sen eliminaatiota munuaisissa (Verschraagen ym. 1999). P-glykoproteiini voi myös indusoida lääkeaineiden vaikutuksesta, eli p-glykoproteiini-induktori voi stimuloida p-glykoproteiinin ilmentymistä. Esimerkiksi digoksiinihoidon rinnalla käytetyn rifampisiinihoidon todettiin lisäävän p-glykoproteiinin määrää suolen epiteelillä merkittävästi, ja oraalisesti annostellun digoksiinin plasmapitoisuus laski merkittävästi (Greiner ym. 1999). Dabigatraanin keskimääräinen $AUC_{0-\infty}$ puolestaan laski 28 %:iin vertailuarvoista, kun dabigatraanihoidon rinnalla käytettiin 10 vuorokauden ajan 600 mg:n rifampisiiniannosta (Lutz ym. 2018).

Toisaalta vaikka yhteisvaikutus ei olisikaan merkittävä plasmapitoisuuden kannalta, voi se kuitenkin joissain tapauksissa aiheuttaa merkittäviä vaikutuksia kudskohtaisissa pitoisuuksissa esimerkiksi keskushermostossa tai istukassa (Lai ym. 2012). Esimerkiksi loperamidi ei normaaliolosuhteissa kulkeudu juuri ollenkaan keskushermostoon eikä aiheuta neurotoksisuutta. Kun p-glykoproteiinin toiminta kuitenkin estyy p-glykoproteiini-inhibiittorin, kuten kiniinin, vaikutuksesta, loperamidin pääsy aivoihin lisääntyy aiheuttaen hengityslamaa (Sadeque ym. 2000).

P-glykoproteiinin kautta välittyvät interaktiot voivat olla myös hyödyllisiä. Esimerkiksi HIV-lääkkeiden pääsyä aivonesteeseen voidaan parantaa annostelemalla lääke yhdessä p-glykoproteiinia inhiboivan lääkeaineen kanssa (Robillard ym. 2014). P-glykoproteiini-inhibiittoreita on myös pidetty potentiaalisena lääkekehityskohteena syövän hoidossa, sillä tällä strategialla voitaisiin mahdollisesti estää lääkeresistenssin syntymistä syövässä (Binkhathlan ja Lavasanifar 2013).

3 P-GLYKOPROTEIININ RAKENNE JA TOIMINTA

3.1 Substraatit

P-glykoproteiinin substraattikirjo on huomattavan laaja (Schinkel ja Jonker 2003). Tämä huomattiin jo varhain, ja myös proteiinin varhainen nimi MDR1 (multi-drug resistance protein 1) korostaa sitä seikkaa, että se antoi solulinjoissa resistenssin useille erilaisille sytotoksisille lääkeaineille (Fojo ym. 1987). P-glykoproteiinin substraateilla ei juurikaan ole yhteisiä rakenteellisia ominaisuuksia, ja niiden koko vaihtelee merkittävästi, noin välillä 200-1900 Da (Schinkel ja Jonker 2003). Fysikaaliskemialliselta luonteeltaan p-glykoproteiinin substraateilla on kuitenkin tärkeä yhtenevyys: ne ovat amfipaattisia, ja suurin osa niistä on melko hydrofobisia. Useimmat niistä ovat lisäksi varauksettomia tai heikosti emäksisiä.

P-glykoproteiinin kliinisesti merkittäviin substraatteihin (Taulukko 1) kuuluu lääkkeitä useista lääkeaineryhmistä, kuten syöpälääkkeistä, HIV-lääkkeistä, loislääkkeistä, hylkimisenestolääkkeistä, ja sydän- ja verisuonilääkkeistä (Schinkel ja Jonker 2003). Monet lääkeaineista toimivat sekä p-glykoproteiinin substraatteina, että myös sen kompetitiivisina inhibiittoreina, kuten esimerkiksi verapamiili ja syklosporiini A.

Taulukko 1. Esimerkkejä p-glykoproteiinin kliinisesti merkittävistä substraateista. P-glykoproteiinin substraattit kuuluvat lukuisiin eri lääkeaineryhmiin ja ovat rakenteellisesti erilaisia (Schinkel ja Jonker 2003).

Lääkeaineryhmä	Substraatti
Syöpälääkkeet	Vinblastiini, vinkristiini, paklitakseli, dosetakseli, doksorubisiini, daunorubisiini
HIV-proteaasin estäjät	Sakinaviiri, ritonaviiri, indinaviiri
H2-reseptorin salpaajat	Simetidiini
Ripulilääkkeet	Loperamidi
Pahoinvointilääkkeet	Ondansetroni
Sydänglykosidit	Digoksiini
Hylkimisenestolääkkeet	Syklosporiini A
Kortikoidit	Deksametasoni, hydrokortisoni
Torjunta-aineet ja loislääkkeet	Ivermektiini
Antibiootit	Erytromysiini
Kalsiumkanavan salpaajat	Verapamiili

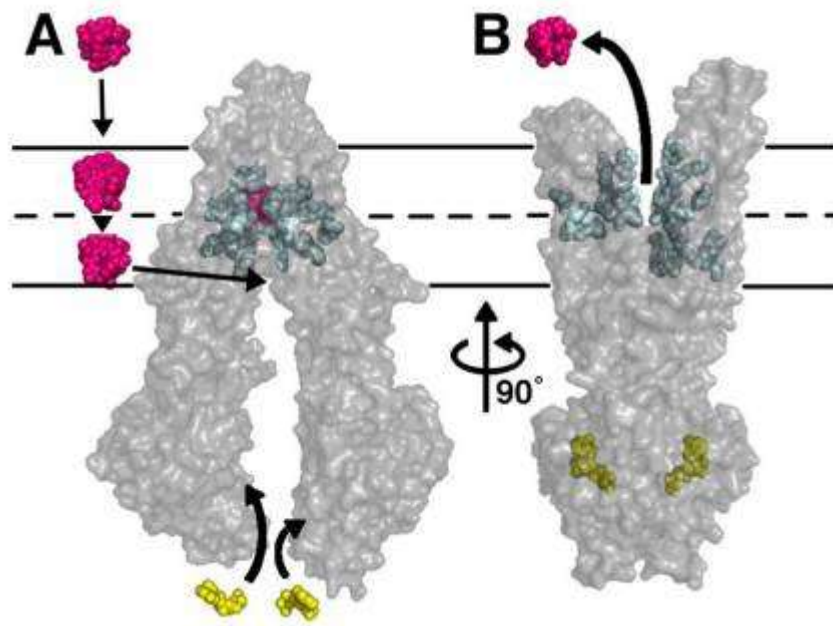
P-glykoproteiinilla on myös monia endogeenisiä substraatteja, kuten steroidihormoneita ja erilaisia lipideitä (Sharom 2014). Lipidien siirtämistä solumembraanin sisemmästä kerroksesta ulompaan kerrokseen onkin pidetty p-glykoproteiinin yhtenä mahdollisena fysiologisena tarkoituksena. Verihiutaleita aktivoivat tekijät ovat todennäköisesti myös p-glykoproteiinin endogeenisiä substraatteja (Sharom 2014), samoin kuin Alzheimerin taudin patofysiologiassa tärkeä beeta-amyloidi (Chai ym. 2020).

3.2 Rakenne ja toimintamekanismi

Ihmisen p-glykoproteiinia koodaava *ABCB1*-geeni sijaitsee kromosomin 7 pitkässä haarassa ja siinä on 32 eksonia (NCBI geenitietokanta, 2021). *ABCB1*-geenin koodaaman valmiin proteiinituotteen pituus on 1280 aminohappoa (Ambudkar ym. 2003). Proteiinin konservoituneen luonteen ansiosta rakennetutkimuksessa on pitkälti kyetty käyttämään apuna muiden lajien, kuten hiiren, p-glykoproteiinia, ja ihmisen p-glykoproteiinin rakenne on selvitetty vasta hiljattain (Kim ja Chen 2018). P-glykoproteiinin rakenne

koostuu kahdesta transmembraanidomeenista, joista kumpikin puolestaan koostuu kuudesta solukalvon lävistävästä segmentistä, sekä kahdesta nukleotidin (ATP) sitovasta domeenista solukalvon solunsisäisellä puolella. P-glykoproteiinin toiminta on ATP:sta riippuvaista, eli p-glykoproteiini käyttää ATP:n hydrolyysia ADP:ksi (adenosiinidifosfaatti) energianlähteenä substraattinsa kuljettamisessa (Ambudkar 1995). Substraatin sitova onkalo sijaitsee transmembraanidomeenien rajapinnassa (Pleban ym. 2005). P-glykoproteiinin kypsymiseen liittyy translaation jälkeen tapahtuvia glykosylaatio- ja fosforylaatioprosesseja, jotka ovat erilaisia eri organismeissa (Di Pietro ym. 1999). Ensimmäisessä solunulkoisessa lenkissä sijaitsee N-glykosyloituja oligosakkaridiketjuja, ja fosforyloituja aminohappotähteitä on kahden p-glykoproteiinin puoliskon välisellä yhdysalueella (ks. Kuva 2 luvussa 4.3). Näillä translaationjälkeisillä modifikaatioilla saattaa olla merkitystä proteiinin oikean laskostumisen ja membraaniin sijoittumisen sekä joidenkin substraattien affiniteetin kannalta.

P-glykoproteiinin toimintamekanismille on esitetty vuosien varrella useita erilaisia teorioita. Näistä teorioista eniten näyttöä on löytynyt hydrofobisen imurin mallille sekä flippaasimallille (Sharom 2014). Molemmat mallit perustuvat siihen olettamukseen, että substraatti on jakautunut solukalvon sisemmän osan lipidifaasiin ennen kuin substraatti kulkeutuu p-glykoproteiinin substraattionkaloon. Hydrofobisen imurin mallin mukaan (Kuva 1) substraatti ikään kuin imeytyy p-glykoproteiinin substraatin sitomiskaloon, mistä se vapautuu solunulkoiseen nesteeseen (Higgins ja Gottesman 1992). Ihmisen p-glykoproteiinin rakennetutkimuksissa on havaittu, että p-glykoproteiinin kuljetussyklissä vuorottelevat sisäänpäin kääntynyt tila, jossa nukleotidin sitovat domeenit ovat erillään, ja ulospäin kääntynyt tila, jossa nukleotidin sitovat domeenit ovat dimerisoituneet (Kim ja Chen 2018). ATP:n sitoutuminen nukleotidin sitovaan domeeniin saa aikaan sen, että p-glykoproteiini isomerisoituu ulospäin kääntyneeseen tilaan, jolloin substraatin sitovan kohdan kolmiulotteinen rakenne muuttuu vähentäen substraatin affiniteettia siihen, ja substraatti vapautuu solun ulkopuolelle. ATP:n hydrolysoituminen puolestaan saa aikaan proteiinin palautumisen takaisin lähtötilanteeseen. P-glykoproteiinin substraattien tiedetään kiihdyttävän proteiinin ATPaasi-aktiivisuutta, todennäköisesti stabiloimalla ATP-hydrolyysin jälkeistä korkeaenergistä tilaa, kun taas substraatin puuttuessa tämä tila on epästabiili (Dastvan ym. 2019).



Kuva 1. P-glykoproteiinin toiminta hydrofobisen imurin mallin mukaan. Lääkeaine (kuvassa punainen molekyyli) ikään kuin imeytyy substraatin sitovaan onkaloon lipidifaasin sisimmästä kerroksesta. ATP-molekyylit (kuvassa keltaisena) sitoutuvat nukleotidin sitoviin alueisiin, joissa tapahtuu dimerisoituminen. ATP:n sitoutumisen vaikutuksesta proteiinin konformaatio muuttuu ulospäin kääntyneeseen tilaan, jolloin substraatti vapautuu solukalvon ulkopuolelle. ATP:n hydrolysoituminen rikkoo nukleotidin sitovien alueiden dimerisoitumisen, ja proteiini palaa takaisin lähtötilanteeseen. (Kuva: Aller ym. 2009)

Flippaasimallin mukaan puolestaan p-glykoproteiini toimisi lipidiflippaasien tavoin, eli kiepauttaisi sisempään solukalvon kerrokseen jakautuneen substraattinsa solumembraanin ulompaan kerrokseen, josta substraatti jakautuisi edelleen solunulkoiseen nesteeseen (Higgins ja Gottesman 1992). Hydrofobisen imurin mallia ja flippaasimallia ei nykytutkimuksen keinoin ole mahdollista erottaa toisistaan, mutta tähänastiset tutkimukset tukevat sitä oletusta, että lipidikerroksella ja sen koostumuksella on merkittävä vaikutus p-glykoproteiinin toimintaan (Sharom 2014).

P-glykoproteiinin laajan substraattikirjon perustaa on tutkittu paljon. P-glykoproteiinin rakenteen joustavuutta pidetään yhtenä syynä sille, että proteiini tunnistaa laajan valikoiman erikokoisia ja rakenteeltaan erilaisia substraatteja (Chufan ym. 2015). Sisäänpäin kääntyneessä muodossa kaksi puoliskoa kääntyilevät siten, että substraatin sitova onkalo voi muuntua moniin eri muotoihin ja kokoihin (Kim ja Chen 2018). Toisaalta myös p-glykoproteiinin oletettu toimintamekanismi, jossa lääkeaineet ovat

ensin jakautuneet solukalvon lipidifaasiin, selittää miksi yhdisteiden fysikaaliskemialliset ominaisuudet kuten lipofiilisyytys ja amfipaattisuus, vaikuttavat siihen, onko lääkeaine p-glykoproteiinin substraatti, enemmän kuin esimerkiksi molekyylin koko tai muoto. Solukalvon kerrokset koostuvat amfipaattisista lipideistä, joten tämä todennäköisesti selittää, miksi p-glykoproteiinin substraattit ovat tyypillisesti amfipaattisia. Lisäksi substraatin sitomisen kalossa on ilmeisesti useita osittain päällekkäisiä alasiitoutumiskohtia (Sharom 2014, Chufan ym. 2015).

4 P-GLYKOPROTEIINISSA ESIINTYVÄ PERINNÖLLINEN MUUNTELU

4.1 Perinnöllisen muuntelun esiintyvyys p-glykoproteiinissa

Mutaatioiden havaittiin jo vuonna 1988 voivan vaikuttaa p-glykoproteiinin toimintaan, kun lääkeresistenteistä solulinjoista löydettiin mutaatio, jonka seurauksena proteiinin 185. glysiini muuttui valiiniksi (Choi ym. 1988). Tämän mutaation havaittiin vaikuttavan substraattispesifisyyteen, muuttaen solulinjojen vastustuskykyä sytotoksisille lääkeaineille: kolkisiiniselektion seurauksena solulinjat tulivat vastustuskykyisemmiksi kolkisiinia kohtaan ja solujen resistenssi vinblastiinia kohtaan väheni. Tätä mutaatiota ei kuitenkaan ilmeisesti ole löytynyt perinnöllisenä mutaationa ihmisistä, vaan se esiintyy ainoastaan solulinjoissa. Perinnöllinen muuntelu p-glykoproteiinissa yhdistettiin ensimmäisen kerran farmakokineettisiin eroihin yksilöiden välillä vuonna 2000, jolloin p-glykoproteiinin geenin 3435. nukleotidissa tapahtuneen yhden emäksen muutoksen havaittiin vaikuttavan p-glykoproteiinin ilmentymistasoon sekä digoksiinin farmakokineetiikkaan (Hoffmeyer ym. 2000). Siitä lähtien tutkimus aiheen ympärillä on jatkunut aktiivisena. 2000-luvulla aloitettujen laajamittaisten sekvensointihankkeiden ansiosta löydettyjen geenivarianttien lukumäärä ihmisen genomissa on moninkertaistunut, ja vuoteen 2015 mennessä p-glykoproteiinin geenissä oli tunnistettu jo 8643 yhden nukleotidin varianttia (SNV, single nucleotide variant), joista 390 oli

geenin koodaavalla alueella, eli alueella, joka määrittelee proteiinin aminohappojärjestyksen (Wolking ym. 2015). Valtaosa näistä varianteista on harvinaisia, mikä tarkoittaa, että harvinaisempi alleeli (varianttialleeli) esiintyy alle 1 %:n frekvenssillä. Vähintään 1 % varianttialleelin esiintyvyyden omaavat yhden nukleotidin variantit luokitellaan SNP:ksi (single nucleotide polymorphism) eli yhden nukleotidin polymorfismeiksi (Keats ja Sherman 2013). Nykyisellään ihmisen p-glykoproteiinin geenin koodaavalla alueella tiedetään esiintyvän ainakin kymmenessä lokuksessa sellaisia variantteja, jotka esiintyvät jossain populaatiossa vähintään 1 %:n frekvenssillä (Taulukko 2). P-glykoproteiinissa esiintyvien polymorfismien yleisyyden eri etnisissä populaatioissa on havaittu vaihtelevan (Kroetz ym. 2003, Kimchi-Sarfaty ym. 2007a). Yleisesti villityypin alleelina pidetään suuremman esiintyvyyden alleelia, mutta joissakin tapauksissa varianttialleeli on yleistynyt tietyissä populaatioissa, jolloin sen esiintyvyys voi jopa ylittää villityypin alleelin esiintyvyyden.

Taulukko 2. Ihmisen p-glykoproteiinin geenissä havaitut koodaavan alueen yhden nukleotidin polymorfismit. Varianttialleelien esiintyvyys eri etnisissä populaatioissa vaihtelee, ja joissain tapauksissa varianttialleeli voi olla populaatiossa jopa yleisempi kuin villityypin alleeli. Polymorfismin rs-numero on koodi, jonka perusteella polymorfismi löytyy eri tietokannoista.

Emäsmuutos geenissä	Aminohappomuutos proteiinissa	SNP:n rs-numero	Variantti-alleelin esiintyvyys
c.61A>G	Asn21Asp	rs9282564	8 % kaukasialaisissa ^[1]
c.781A>G	Ile261Val	rs36008564	1,5 % afrikanamerikkalaisissa ^[1]
c.1199G>A	Ser400Asn	rs2229109	12,9 % kaukasialaisissa ^[2]
c.1199G>T	Ser400Ile	rs2229109	2,3 % leukemiatilaisissa ^[3]
c.1236C>T	Gly412Gly, ei muutosta	rs1128503	68,5 % aasialaisissa ^[1]
c.1474C>T	Arg492Cys	-	1,4 % kaukasialaisissa ^[2]
c.2005C>T	Arg669Cys	rs35023033	1 % afrikanamerikkalaisissa ^[2]
c.2677G>T	Ala893Ser	rs2032582	46,5 % kaukasialaisissa ^[2]
c.2677G>A	Ala893Thr	rs2032582	21,8 % japanilaisissa ^[2]
c.3421T>A	Ser1141Thr	rs2229107	11,1 % afrikanamerikkalaisissa ^[1]
c.3435C>T	Ile1145Ile, ei muutosta	rs1045642	60 % intialaisissa ^[4]
c.3751G>A	Val1251Ile	rs28364274	5 % meksikolaisissa ^[1]

Lähteet: [1] Wolking ym. 2015, [2] Sakurai ym. 2007, [3] Crouthamel ym. 2006, [4] Fung ja Gottesman 2009

Joidenkin polymorfismien tiedetään olevan keskenään kytkentäepätasapainossa, eli niiden periytyminen ei ole sattumanvaraista, vaan tietyt variantit periytyvät yhdessä useammin kuin niiden pitäisi sattumanvaraisen yhdistymisen kautta. Tämä ilmiö on havaittu erityisesti kolmen yleisimmän p-glykoproteiinipolymorfismin c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T kohdalla (Kim ym. 2001, Kroetz ym. 2003). Tällaisten yhdessä periytyvien varianttien sanotaan muodostavan keskenään haplotyyppejä. On arveltu, että haplotyyppien tutkiminen yksittäisten polymorfismien sijaan voi antaa enemmän tietoa mutaatioiden vaikutuksesta fenotyyppiin (Kroetz ym. 2003), ja erityisesti *in vivo* -tutkimukset ovatkin viime aikoina painottuneet tutkimaan eri haplotyyppien vaikutuksia p-glykoproteiiniaktiivisuuteen tai lääkevaikutukseen.

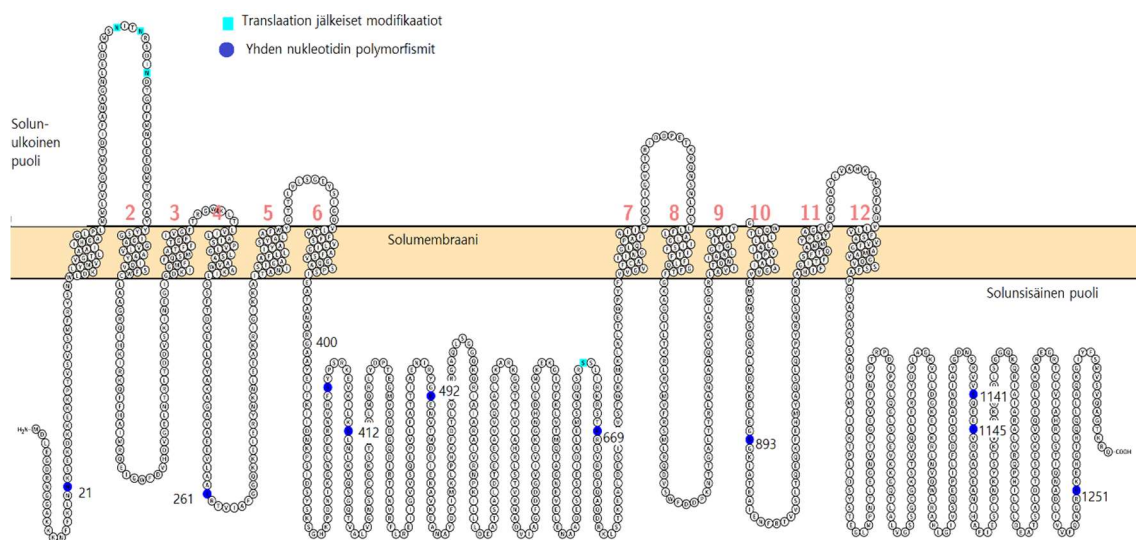
4.2 Polymorfismien aiheuttamat molekyyli-tason vaikutukset

Kuljetinproteiinien geeneissä esiintyvä polymorfismi voi vaikuttaa lääkeaineiden kuljetukseen joko proteiinin ilmentymistason tai sen kuljetusaktiivisuuden muutosten kautta (Yee ym. 2018). Proteiinin kolmiulotteinen rakenne on riippuvainen sen aminohappojärjestyksestä, ja esimerkiksi aminohapon vaihtuminen toiseksi substraatin sitoutumiskohdassa voi suoraan vaikuttaa kuljetinproteiinin substraatin sitomiskykyyn, tai proteiinin stabiilisuus tai kohdentuminen solukalvolle voi muuttua aminohappomuutoksen seurauksena. Aminohappomuutoksen aiheuttavien mutaatioiden vaikutusten ajatellaan yleisesti olevan sitä suurempia, mitä suurempi ero alkuperäisen ja uuden aminohapon välillä on esimerkiksi aminohapon koon ja polaarisuuden suhteen (Grantham 1974). Toisaalta myös ei-koodaavilla alueilla tapahtuvat mutaatiot ja koodaavan alueen synonyymiset mutaatiot (mutaatiot joissa aminohappo ei vaihdu, vaikka nukleotidi vaihtuu) voivat vaikuttaa proteiinin ilmentymistasoon transkriptionopeuden tai lähetti-RNA:n stabiilisuuden muutoksien kautta (Yee ym. 2018). P-glykoproteiinissa tiedetäänkin esiintyvän yhden nukleotidin polymorfismeja myös ei-koodaavilla alueilla, kuten geenin 3'-päässä, sekä intronisilla alueilla (Fung ja Gottesman 2009). Näitä polymorfismeja ei kuitenkaan ole vielä tutkittu juurikaan, mistä syystä tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään koodaavan alueen polymorfismeihin.

4.3 Polymorfismien sijainti proteiinissa

Kuten aiemmin todettiin, p-glykoproteiini on varsin konservoitunut eri lajien homologien välillä, esimerkiksi hiiren vastaavan proteiinin aminohappojärjestys on 87 % identtinen ihmisen p-glykoproteiinin kanssa (Wolf ym. 2011). Joissain osissa proteiinia periytyviä mutaatioita esiintyy useammin kuin toisissa, eli toiset alueet proteiinissa ovat konservoituneempia kuin toiset. Suurin osa p-glykoproteiinin koodaavan alueen polymorfismeista sijaitsee proteiinin nukleotidin sitovilla alueilla proteiinin solunsisäisessä osassa (Kuva 2). Sitä vastoin transmembraanialueella variantit ovat harvinaisempia. Tämä viittaa siihen, että proteiinin transmembraanialueen, joka ankkuroi proteiinin solukalvoon sekä muodostaa substraatin sitovan alueen, rakenne on tärkeä, eikä

tässä alueessa proteiinin evoluution aikana ole juurikaan siedetty vaihtelua (Fung ja Gottesman 2009). Polymorfismeja ei esiinny myöskään sellaisissa sijainneissa, jotka muuttaisivat proteiinin glykosylaatiota tai fosforylaatiota, mikä korostaa näiden translaationjälkeisten modifikaatioiden tärkeyttä proteiinin toiminnalle. Kirjallisuudessa on kuvailtu hiljattain myös potilastapaus, jossa mutaatio aiheutti p-glykoproteiiniin ennen aikaisen pysäytyskodonin ja siten toimimattoman proteiinin syntymisen, johtaen ivermektiinimyrkytykseen (Baudou ym. 2020). Tällaiset mutaatiot ovat kuitenkin nykytiedon mukaan hyvin harvinaisia, eivätkä ne siksi täytä polymorfismin kriteereitä.



Kuva 2. Ihmisen p-glykoproteiinissa vähintään 1 %:n frekvenssillä jossain populaatiossa esiintyvät variantit sijaitsevat solumembraanin solunsisäisellä puolella. Kuva on luotu käyttämällä Protter-verkkotyökalua (Omasits ym. 2014) ja proteiinisekvenssin perustana käytettiin UniProt-tunnusta P08183.

4.4 Tutkimusnäyttö eri polymorfismien vaikutuksista

P-glykoproteiinissa esiintyvistä koodaavan alueen polymorfismeista eniten on tutkittu kolmea yleisintä polymorfismia c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T (Wolf ym. 2011). Tutkimuksia on tehty sekä *in vivo* että *in vitro*, ja osassa tutkimuksista on tutkittu polymorfismeja haplotyypeinä. Seuraavissa osioissa kerrotaan polymorfismien vaikutuksia koskevasta tutkimusnäytöstä esitellen ensin kolme yleisintä polymorfismia sekä niiden haplotyyppit, ja tämän jälkeen muut polymorfismit esiintyvyyssjärjestyksessä.

4.4.1 Polymorfismi c.3435C>T

Polymorfismi c.3435C>T ei aiheuta aminohapon muutosta p-glykoproteiinissa, vaan sekä villityypissä että variantissa proteiinin 1145. aminohappo on isoleusiini (Fung ja Gottesman 2009). Tämä p-glykoproteiinin toisessa ATP:tä sitovassa alueessa sijaitseva aminohappo on hyvin konservoitunut eri eläinlajeilla. Polymorfismi c.3435C>T on levinnyt osassa populaatioista hyvinkin laajalle: afrikkalaista alkuperää olevissa populaatioissa T-alleelin esiintyvyys on pienin (noin 10–20 %), kaukasialaisissa populaatioissa T-alleeli on suunnilleen yhtä yleinen kuin C-alleelikin, ja osassa aasialaisista populaatioista T-alleeli on jopa dominoiva noin 60 % esiintyvyydellä. Tämä polymorfismi oli ensimmäinen p-glykoproteiinipolymorfismi, jolla havaittiin olevan yhteys lääkeaineen farmakokinetiikkaan. Hoffmeyer ym. (2000) tutkivat pohjukaissuolinäytteiden p-glykoproteiinin ilmentymistason ja digoksiinin plasmapitoisuuden korrelaatiota p-glykoproteiinin polymorfismeihin 21 vapaaehtoisesta ja potilaasta koostuvassa kaukasialaisessa populaatiossa. T-variantin suhteen homotsygooteissa näytteissä p-glykoproteiinin ilmentymistaso oli yli kaksi kertaa alempi kuin C-alleelin suhteen homotsygooteissa, ja heterotsygooteissa taas ilmentymistaso oli näiden välillä. Lisäksi havaittiin, että koehenkilöiden oraalisesti annostellun digoksiinin plasmapitoisuus oli keskimäärin 38 % suurempi T-alleelin suhteen homotsygooteilla koehenkilöillä kuin C-alleelin suhteen homotsygooteilla.

Polymorfismin c.3435C>T yhteyttä p-glykoproteiinin ilmentymistasoon on selvitetty ainakin kahdessa muussakin tutkimuksessa. Morita ym. (2003) tutkivat c.3435C>T-polymorfismia *in vitro* erilaisina kombinaatioina yhdessä c.2677 G>T/A-polymorfismien kanssa pysyvästi transfektoiduissa LLC PK1 -soluissa. Tässä tutkimuksessa ei havaittu merkittävää eroa 3435T-alleelilla verrattuna villityyppiin kummankaan ilmentymistason tai p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuden suhteen, ja tutkijat ehdottivat, että havaitut erot aiempiin tutkimuksiin voivat johtua esimerkiksi c.3435C>T-polymorfismin kytkeytymisestä muihin vielä tuntemattomiin polymorfismeihin, tai p-glykoproteiinin indusoitumisesta ympäristötekijöiden vaikutuksesta. Toisessa tutkimuksessa ihmisen maksanäytteissä sitä vastoin havaittiin, että 3435C-alleelin omaavissa näytteissä lähetti-RNA:n (mRNA) määrä oli merkittävästi suurempi kuin 3435T-alleelin omaavissa (Wang ym. 2005). Lisäksi transkription lopettamisen jälkeen 3435C/3435T-suhde kasvoi, minkä

tutkijat päättelivät johtuvan siitä, että 3435T-alleeli heikentää mRNA:n stabiilisuutta. Kolmannessa tutkimuksessa mRNA-määrässä eikä myöskään p-glykoproteiinin proteiinitason ilmentymisessä havaittu 3435T-variantin ja villityypin välillä eroa *Vaccinia*-viruksella infektoiduissa HeLa-soluissa, mutta 3435T-variantin sisältävän p-glykoproteiinin inhibitioherkkyys erosi villityypin p-glykoproteiinista syklosporiini A:n ja verapamiilin suhteen (Kimchi-Sarfaty ym. 2007b). Tutkijat päättelivät, että c.3435C>T polymorfismi aiheuttaa proteiinin konformaatioissa pienen muutoksen huolimatta siitä, että synonyyminen mutaatio ei aiheuta aminohapon vaihdosta proteiinissa. Konformaatiolle herkkä p-glykoproteiinin vasta-aine sitoutui eri tavalla varianttiproteiiniin verrattuna villityyppiin, sekä myös varianttiproteiinin ja villityypin herkkyydessä trypsiinijohdattamiselle havaittiin pieniä eroja. Tällainen vaikutus voi tutkijoiden mukaan välittyä sitä kautta, että yleisen kodonin muuttuminen harvinaiseksi kodoniksi vaikuttaa translaation aikana tapahtuvan proteiinilaskostumisen ajoittumiseen, ja sitä kautta proteiinin rakenteeseen. Synonyymisen mutaation aiheuttama vaikutus proteiinin rakenteeseen voi kohdistua aminohapon itsensä sijasta mutaatiokohdan lähellä oleviin aminohappoihin tai proteiinidomeeneihin (Fung ja Gottesman 2009). Vaikutus saattaa olla suurempi silloin, kun solu tuottaa paljon p-glykoproteiinia, sillä tällöin harvinaista kodonia vastaavat siirtäjä-RNA:t (tRNA) solussa käyvät vähiin (Kimchi-Sarfaty ym. 2007b).

Tutkittaessa p-glykoproteiinin polymorfismien vaikutusta gemtutsumabi-otsogamisiinihoidon tuloksiin akuutissa myeloidissa leukemiassa havaittiin, että potilailla, joilla oli homotsygoottinen 3435T-alleeli, hoidon tulos oli merkitsevästi parempi kuin 3435CC-potilailla (Rafiee ym. 2019). Viiden vuoden EFS-arvo (event free survival), joka kuvaa syövästä parantumista ilman syövän uusiutumista, oli TT-ryhmässä 56 % ja CC-ryhmässä 44 %. Kyseisen lääkkeen vaikutusmekanismi perustuu vasta-aineeseen sidotun sytotoksisen yhdisteen kalikeamisiinin pääsyyn solun sisälle, ja p-glykoproteiinin on osoitettu voivan pumpata kalikeamisiinia ulos soluista. Tutkimuksessa osoitettiin lisäksi *in vitro*, että c.3435C>T-variantti johti transfektoiduissa HL-60-soluissa lisääntyneeseen DNA-vaurioon kalikeamisiinikäsittelyn jälkeen, sekä lisääntyneeseen solukuolemaan. Toisin sanoen tutkimuksen tulokset viittasivat siihen, että 3435T-alleelin omaava proteiini olisi tehottomampi kalikeamisiinin kuljettamisessa kuin villityyppi. Dosetakselin suhteen taas on havaittu päinvastainen vaikutus: c.3435C>T-variantti johti

vähentyneeseen dosetakselin solunsisäiseen kertymiseen sekä lisääntyneeseen resistenssiin dosetakselia kohtaan munasarjasyöpäsolulinjoissa, eli T-variantti vaikutti johtavan tehokkaampaan dosetakselin kuljetukseen villityyppiin verrattuna (Yin ym. 2019).

4.4.2 Polymorfismit c.2677G>T ja c.2677G>A

Kolmealleelinen polymorfismi c.2677G>T/A on ainoa kolmesta yleisimmästä polymorfismista, joka johtaa aminohapon vaihtumiseen. Villityypin 893. aminohappo alaniini on vaihtunut c.2677G>T-variantissa seriiniksi, ja c.2677G>A-variantissa treoniiniksi (Wolking ym. 2015). Yleisempi varianttialleeli c.2677G>T on harvinainen afrikkalaista alkuperää olevissa populaatioissa, mutta aasialaisissa ja kaukasialaisissa populaatioissa yleinen, jopa yli 45%:n frekvenssillä esiintyvä (Sakurai ym. 2007). Harvinaisempi varianttialleeli c.2677G>A esiintyy enimmäkseen aasialaisissa populaatioissa: esimerkiksi japanilaisessa populaatiossa kyseinen variantti esiintyy jopa yli 20%:n frekvenssillä.

Tutkittaessa yleisemmän c.2677G>T-alleelin vaikutuksia p-glykoproteiinin ilmentymiseen tai aktiivisuuteen HEK293T-soluissa, variantin ei havaittu vaikuttavan proteiinin ilmentymistasoon, mutta varianttialleeli johti 47 % alempaan solunsisäiseen digoksiinikonsentraatioon villityyppiin verrattuna, eli variantin pääteltiin toimivan villityyppiä tehokkaammin (Kim ym 2001). Lisäksi kyseisen aminohappomuutoksen havaittiin olevan koehenkilöillä yhteydessä feksofenadiinin alempaan biologiseen hyötyosuuteen oraalisen annostelun jälkeen, mikä tuki *in vitro* -löydöstä. Tämänkin variantin suhteen eri tutkimuksista saadut tulokset ovat kuitenkin olleet ristiriidassa. Morita ym. (2003) tutkivat 2677T-varianttia pysyvästi transfektoiduissa LLC PK1 -soluissa, mutta kyseisellä polymorfismilla ei tässä tutkimuksessa havaittu eroa p-glykoproteiinin ilmentymistason tai kuljetusaktiivisuuden suhteen. Sakurai ym. (2007) puolestaan havaitsivat Sf9-hyönteissoluilla tehtyissä kokeissa, että c.2677G>T-variantilla oli alhaisempi kuljetusnopeus verapamiilin ja nikardipiinin suhteen kuin villityypillä.

Harvinaisemman c.2677G>A-varianttialleelin on osoitettu Sf9-soluissa aiheuttavan p-glykoproteiinin lisääntyneen ATPaasi-aktiivisuuden ja useiden lääkeaineiden

voimistuneen effluksin verrattuna villityyppiin (Sakurai ym. 2007). Lisäksi varianttialleelilla oli vaikutusta substraattispesifisyyteen. Kliinisiä vaikutuksia tutkittaessa on havaittu, että alleelilla oli todennäköinen yhteys lääkeresistenssin syntymiseen tuberkuloosin hoidossa käytettäville rifampisiinille ja etambutolille (Rodríguez-Castillo ym. 2015). Toisessa tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että feksofenadiinin oraalisen kerta-annoksen kokonaisaltistus (AUC) oli 17% pienempi potilasryhmällä, joka oli 2677A-alleelin suhteen homotsygootti, kuin 2677G-alleelin suhteen homotsygoottisella vertailuryhmällä (Yi ym. 2004). Nämä kliiniset tulokset ovat linjassa *in vitro* -tutkimuksen kanssa, jonka mukaan 2677A-alleeli toimisi tehokkaammin kuin villityyppi. 2677A-alleelin harvinaisuuden vuoksi se on useissa tutkimuksissa niputettu yhteen 2677T-alleelin kanssa, vaikka sen genotyyppi olisikin tutkimuksissa selvitetty. Tällainen käytäntö voi johtaa tulosten väärään tulkintaan.

4.4.3 Polymorfismi c.1236C>T

Kolmas yleinen polymorfismi c.1236C>T ei johda aminohappomuutokseen, vaan sekä villityypissä että variantissa p-glykoproteiinin 412. aminohappo on glysiini, joka sijaitsee proteiinin nukleotidin sitovan domeenin ulkopinnalla (Wolf ym. 2011). Eniten c.1236C>T-polymorfismia esiintyy aasialaisissa: esimerkiksi kiinalaisessa populaatiossa sen esiintyvyys on noin 68 %.

Aird ym. (2007) tutkivat p-glykoproteiinin ilmentymistä 3T3-fibroblasteissa siten, että c.1236C>T-variantti esiintyi eri kombinaatioina muiden kahden yleisimmän variantin kanssa. Tutkimuksessa havaittiin, että c.1236C>T-variantti vaikutti merkittävästi p-glykoproteiinin ilmentymistasoon riippumatta siitä, olivatko myös 2677- ja 3435-alleelit T-variantteja. P-glykoproteiinin ilmentyminen väheni jopa 20-kertaisesti c.1236C>T-variantin läsnäollessa. Lisäksi 3T3-fibroblastien herkkyys sytotoksiselle SJG-136-lääkeaineelle korreloi käänteisesti p-glykoproteiinin ilmentymistason kanssa. Immortalisoiduissa lymfosyyteissä, joissa p-glykoproteiini ilmentyy huomattavasti matalammalla tasolla kuin fibroblasteissa, vastaavaa korrelaatiota ei kuitenkaan havaittu, mistä tutkijat päättelivät tämän polymorfismin aiheuttaman vaikutuksen tulevan esiin vain silloin, kun p-glykoproteiini ilmentyy korkeina määrinä.

Jiang ym. (2019) tutkivat c.1236C>T-variantin vaikutusta osteosarkoomalääkkeiden kuljetukseen stabiilisti transfektoidussa Caco-2-solulinjassa, jossa oli todennettu matala endogeeninen p-glykoproteiinituotanto. Varianttialleelin havaittiin lisäävän 2,6-kertaisesti metotrekseenin ja 3-kertaisesti etoposidin effluksia verrattuna villityypin alleleihin, sitä vastoin kuitenkin vähentäen doksorubisiinin effluksia noin kolmasosaan villityypin kuljetuksesta. Tutkijat totesivat, että c.1236C>T-variantti vaikuttaa p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuteen substraattispesifisellä tavalla.

Kliinisesti c.1236C>T-variantti on yhdistetty homotsygooteissa potilaissa suurempaan altistumiseen syöpälääke irinotekaanille sekä sen aktiiviselle metaboliitille (Mathijssen ym. 2003). Lisäksi c.1236C>T-variantin on havaittu korreloivan merkittävästi korkeamman efavirensi-plasmapitoisuuden kanssa T-alleelin suhteen sekä homotsygooteilla että heterotsygooteilla potilailla eteläafrikkalaisessa HIV-potilasjoukossa (Swart ym. 2012).

4.4.4 Polymorfismien c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T muodostamat haplotyypit

Kuten edellä on mainittu, p-glykoproteiinin kolme yleisintä polymorfismia c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T esiintyvät keskenään kytkentäepätasapainossa. Tämän takia yksittäisen polymorfismin vaikutusten tutkiminen on haastavaa erityisesti kliinisessä potilasaineistossa. Lisäksi on huomattava, että useissa tutkimuksissa, joissa on tutkittu vain yhtä kolmesta yleisimmästä polymorfismista, ei genotyyppiä muiden kahden polymorfismin suhteen ole selvitetty. Tällöin niiden vaikutusta tutkimuksen tulokseen ei voida poissulkea. Suurin osa p-glykoproteiinipolymorfismien vaikutuksia selvittävistä tutkimuksista, erityisesti kliinisistä, onkin keskittynyt yleisimpien polymorfismien muodostamien haplotyyppien tutkimiseen (Wolf ym. 2011). Osassa tutkimuksissa on tutkittu kahta polymorfismia yhdessä, ja osassa kaikkia kolmea.

Haplotyyppien esiintyvyys eri etnisissä ryhmissä vaihtelee voimakkaasti (Fung ja Gottesman 2009). Afrikkalaista alkuperää olevissa kansoissa villityypin haplotyyppi CGC on yleisin, kun taas varianttihaklotyyppi TTT on yleisin haplotyyppi aasialaisissa ja intialaisissa populaatioissa. Kaukasialaisissa populaatioissa CGC ja TTT-haplotyyppijä

esiintyy suunnilleen yhtä paljon. Lisäksi esiintyy villityyppi- ja varianttialleelien eri yhdistelmistä muodostuvia ”välimuoto”haplotyyppejä.

Vaikka haplotyyppivaikutuksia on tutkittu melko paljon, ovat tulokset valitettavasti olleet monelta osin ristiriitaisia, eikä varmoja johtopäätöksiä ole pystytty juurikaan vetämään (Leschziner ym. 2007). Esimerkiksi Kurata ym. (2002) osoittivat, että homotsygoottinen T-alleeli 2677- ja 3435-kohdissa korreloi digoksiinin korkeamman biologisen hyötyosuuden kanssa japanilaisessa populaatiossa, sekä digoksiinin eliminaatio munuaisissa oli alhaisempi tällä ryhmällä kuin villityypin alleelit omaavalla ryhmällä. Toisaalta toisessa tutkimuksessa havaittiin päinvastoin T-alleelien vastaavissa kohdissa korreloivan alhaisemman seerumin digoksiinipitoisuuden kanssa niinikään myöskin japanilaisessa populaatiossa (Horinouchi ym. 2002).

Vivona ym. (2014) tutkivat yleisimpien polymorfismien vaikutusta imatinibimesylaatin hoitovasteeseen kroonista myeloidista leukemiaa sairastavilla potilailla. Homotsygoottisen CGC-villityypin havaittiin johtavan heikompaan hoitotulokseen kuin homotsygoottisen TTT-haplotyyppin tai heterotsygoottisen 1236CT/3435CT/2677GT-haplotyyppin. Potilaiden p-glykoproteiiniaktiivisuus eristetyissä mononukleaarisisissa verisoluissa määritettiin tutkimalla rodamiini 123:n kuljetusaktiivisuutta, ja p-glykoproteiinivälitteinen effluksi oli villityypin ryhmässä keskimäärin 1,5-kertainen varianttiryhmään verrattuna. Villityyppihaplotyyppin potilaat saavuttivat harvemmin merkittävän molekulaarisen vasteen (MMR, major molecular response) kuin varianttihaplotyyppin potilaat. *In vitro* puolestaan on osoitettu kahdessa eri solulinjassa, että TTT-haplotyyppi heikensi p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuutta laskien imatinibin IC₅₀-arvoa 62 %:iin villityyppi CGC:n vastaavasta, mikä on linjassa edellä mainittujen kliinisten tutkimusten suhteen (Dessilly ym. 2016a). Sitä vastoin merkitseviä vaikutuksia ei havaittu muiden tutkimuksessa mukana olleiden tyrosiinikinaasi-inhbiittoreiden (nilotinibin, dasatinibin tai ponatinibin) kuljetusaktiivisuuden suhteen, eli vaikutus oli substraatista riippuvainen. On kuitenkin huomattava, että kliinisistä tutkimuksista on saatu myös risteäviä tutkimustuloksia: imatinibihoidon vastetta tutkivassa meta-analyysissä todettiin 3435T-alleelin ja 2677G-alleelin ennustavan huonompaa vastetta imatinibimesylaatile, kun taas 1236C-alleelien huomattiin korreloivan paremman vasteen kanssa aasialaisissa potilaissa (Zheng ym. 2015).

Haplotyyppivaikutusten erilaisuus eri substraattien suhteen on havaittu muissakin tutkimuksissa. TTT-varianttiproteiinin havaittiin kuljettavan mitoksantronia LLC-PK1-solulinjassa 10-kertaisesti tehokkaammin villityyppiin verrattuna, mutta vinblastiinin suhteen eroja ei havaittu (Fung ym. 2014). Homotsygoottisen TTT-genotyypin on havaittu suurentavan merkittävästi koehenkilöiden simvastatiinihapon (60 % suurempi AUC_{0-12h}) ja atorvastatiinin (55 % suurempi $AUC_{0-\infty}$) kokonaisaltistusta verrattuna homotsygoottiseen CGC-genotyypiin, sekä pidentävän atorvastatiinin puoliintumisaikaa 24 %:lla (Keskitalo ym. 2008), kun taas fluvastatiinin, pravastatiinin, lovastatiinin tai rosuvastatiinin suhteen merkittävää eroa ei havaittu (Keskitalo ym. 2009). Lisäksi on osoitettu post mortem -aineistoa tutkimalla, että yleisimmät polymorfismit olivat yhteydessä venlafaksiinimyrkytyksiin, mutta sitalopraamin kohdalla vastaavaa yhteyttä ei havaittu (Karlsson 2013). TT-alleelin esiintyvyyden yleisimmissä polymorfismikohdissa havaittiin olevan merkittävästi alhaisempi venlafaksiinimyrkytysryhmässä kuin siinä ryhmässä, joka oli kuollut muista syistä. Lisäksi tutkimusaineistosta havaittiin, että TT-alleelin omaava henkilö kuoli todennäköisimmin (ei myrkytysperäisen) itsemurhan seurauksena. Tällainen eroavaisuus saattaa kertoa riittämättömästä hoitotehosta, lääkehoitoon liittyvistä vaikeista sivuvaikutuksista, tai lääkkeen aiheuttamasta itsemurha-alttiudesta, ja saattaa liittyä eroihin siinä, miten venlafaksiini pääsee verenkierrosta aivokudokseen.

Koska c.2677G>T/A on kolmesta yleisimmästä polymorfismista ainoa, joka aiheuttaa aminohappomuutoksen, on esitetty, että muiden kahden yleisimmän polymorfismin näennäiset vaikutukset johtuisivatkin siitä (Sakurai ym. 2007). Toisaalta etenkin c.3435C>T-polymorfismin vaikutuksista on paljon tutkimustietoa, ja synonyymisen mutaation tiedetään voivan vaikuttaa proteiinin konformaatioon laskostumisen ajoittumisen kautta. Saattaakin olla, että jokainen näistä kolmesta polymorfismista osallistuu haplotyyppien ominaisuuksien muodostamiseen aiheuttamalla konformaatioissa pieniä muutoksia, jotka yhdessä voivat saada aikaan havaitut vaikutukset (Fung ja Gottesman 2009).

4.4.5 Polymorfismit c.1199G>A ja c.1199G>T

P-glykoproteiinin geenin 1199. emäksessä esiintyvistä kahdesta polymorfismista yleisempää c.1199G>A-varianttia on tutkittu enemmän. Kyseinen variantti aiheuttaa proteiinissa 400. aminohappotähteen vaihtumisen seriinistä asparagiiniksi ensimmäisessä ATP:ta sitovassa domeenissa (Crouthamel ym. 2006), ja sen on todettu esiintyvän 12,9 %:n frekvenssillä kaukasialaisissa (Sakurai ym. 2007). Harvinaisempi varianttialleeli c.1199G>T puolestaan löydettiin leukemiatilasta koostuvaa aineistoa tutkittaessa, jossa kyseinen variantti esiintyi 2,3 %:n frekvenssillä (Crouthamel ym. 2006). Polymorfismi c.1199G>T aiheuttaa p-glykoproteiinin 400. aminohapon vaihtumisen seriinistä isoleusiiniksi.

Kimchi-Sarfaty ym. (2002) tutkivat c.1199G>A-polymorfismin vaikutusta useiden fluoresoivien substraattien kuljetukseen HeLa-soluissa. Kyseisen mutaation ei havaittu aiheuttavan merkitsevää muutosta verrattuna villityyppiin. Polymorfismi ei aiheuttanut merkitsevää muutosta myöskään kalseiini-AM:n tai BODIPY FL:n kuljetusaktiivisuuteen HEK293-soluissa (Gow ym. 2008), eikä darunaviirin kertymisessä HEK293-soluihin (Stillemans ym. 2021). Sitä vastoin imatinibia, nilotinibia ja dasatinibia c.1199G>A-varianttiproteiini kuljetti HEK293- ja K562 -solulinjoissa tehokkaammin kuin villityyppi (Dessilly ym. 2016b). Ainakin kahdessa tutkimuksessa polymorfismin vaikutusten on lisäksi havaittu olevan substraatista riippuvaisia. Ilmennettäessä c.1199G>A mutaation omaavaa p-glykoproteiinia LLC PK1 -epiteelisoluissa, rodamiini 123:n kuljetus oli merkittävästi heikentynyt varianttisoluissa verrattuna villityyppiin, mikä ilmeni rodamiini 123:n 4,75-kertaisena kertymisellä varianttisoluihin villityyppiin verrattuna (Woodahl ym. 2004). Sitä vastoin sytotoksisuuskokeissa c.1199G>A mutantti oli enemmän resistentti vinblastiinille ja vinkristiinille, mutta doksorubisiinin suhteen ei havaittu eroja. HEK293- ja K562-solulinjoissa takrolimuusin kuljetus heikentyi varianttialleelin vaikutuksesta, mutta syklosporiini A:n, rodamiini 123:n tai doksorubisiinin kuljetukseen mutaatiolla ei ollut merkitsevää vaikutusta, ja vinblastiinin kuljetustehokkuus varianttialleelilla oli puolestaan parempi verrattuna villityyppiin (Dessilly ym. 2014).

Tutkittaessa harvinaisempaa c.1199G>T-varianttia, havaittiin että c.1199G>T ja c.1199G>A aiheuttivat HEK-soluissa villityyppiin verrattuna muutoksia resistenssiin

sytotoksisia lääkkeitä kohtaan, ja nämä muutokset olivat varianteilla keskenään päinvastaiset (Crouthamel ym. 2006). Villityyppiin verrattuna c.1199G>A -mutaatio aiheutti lisääntynyttä resistenssiä doksorubisiinille, paklitakselille, vinblastiinille ja vinkristiinille, kun taas c.1199G>T-mutaation kohdalla havaittiin 2–3-kertaisesti vähentynyt resistenssi sytotoksille lääkkeitä verrattuna villityyppiin. Näiden polymorfismien ei havaittu aiheuttavan muutoksia p-glykoproteiinin ilmentymistasoon soluissa.

4.4.6 Polymorfismi c.3421T>A

P-glykoproteiinin c.3421T>A-polymorfismi esiintyy afrikkalaisamerikkalaisessa populaatiossa noin 11 %:n frekvenssillä (Wolking ym. 2015). Mutaatio aiheuttaa seriinin vaihtumisen treoniiniksi proteiinin 1141. aminohappotähteessä. Polymorfismin c.3421T>A on osoitettu korreloivan suuremman fenytoinin plasmapitoisuuden kanssa afrikkalaisessa populaatiossa (Allabi ym. 2005). Lisäksi polymorfismia on tutkittu *in vitro* ainakin kahdessa tutkimuksessa. Varianttialleelin c.3421T>A havaittiin vaikuttavan resistenssiin sytotoksisia lääkkeitä kohtaan substraatista riippuvaisella tavalla: se lisäsi 1,3-kertaisesti resistenssiä sytotoksista doksorubisiinia kohtaan hiivasoluilla tehdyssä sytotoksisuuskokeessa, mutta ei daunorubisiinia kohtaan (Jeong ym. 2007). Gow ym. (2008) puolestaan eivät havainneet kyseisen mutaation aiheuttavan merkitsevää muutosta proteiinitason ilmentymiseen eikä kalseiini-AM:n tai BODIPY FL:n kuljetustehokkuuteen, mutta sitä vastoin havaitsivat c.3421T>A-variantin olevan villityypin p-glykoproteiiniin verrattuna 27 % vähemmän herkkä syklosporiini A -inhibitiolle.

4.4.7 Polymorfismi c.61A>G

Polymorfismia c.61A>G on tavattu eniten kaukasialaisissa populaatioissa, joissa sen esiintyvyys on noin 8 %, sekä vähäisemmässä määrin afrikkalaisamerikkalaisissa ja aasialaisissa populaatioissa (Wolking ym. 2015). Polymorfismi aiheuttaa p-glykoproteiinin 21. aminohapon vaihtumisen asparagiinista asparagiinihapoksi.

Polymorfismin vaikutusta fluoresoivan paklitakselikonjugaatin kuljetusaktiivisuuteen on tutkittu kahdessa eri *in vitro* -tutkimuksessa, ja kummassakaan c.61A>G-variantin kuljetus ei eronnut merkittävästi villityypistä (Kimchi-Sarfaty ym. 2002, Gow ym. 2008). Kalseiini-AM-kuljetuksen herkkyyden syklosporiini A -inhibitiorille sitä vastoin havaittiin kasvavan polymorfismin vaikutuksesta (Gow ym. 2008). Hiljattain c.61A>G-polymorfismilla havaittiin lisäksi olevan tilastollisesti merkitsevä yhteys munuaissiirtopotilaiden annossovitettujen takrolimuusin jäännöspitoisuuksien (trough concentration) kanssa, pitoisuuden ollessa keskimäärin 26% pienempi c.61A>G-variantin omaavilla potilailla (Hu ym. 2018).

4.4.8 Polymorfismi c.3751G>A

Polymorfismia c.3751G>A on tavattu vain meksikolaisessa populaatiossa, missä sen yleisyys on 5 % (Kroetz ym. 2003). Mutaatio aiheuttaa p-glykoproteiinissa 1251. aminohapon vaihtumisen valiinista isoleusiiniksi. *In vitro* -tutkimuksessa HEK293-soluissa havaittiin, että c.3751G>A-varianttiproteiinin kalseiini-AM-kuljetus oli tehostunut verrattuna villityyppiin, sekä BODIPY-FL-paklitakselin kuljetusta mittaavassa kokeessa variantti oli vähemmän herkkä syklosporiini A -inhibitiorille villityyppiin verrattuna (Gow ym. 2008). Kliinisesti c.3751G>A-polymorfismin on osoitettu olevan yhteydessä suurempaan hepatosellulaarisen karsinooman esiintyvyyteen kiinalaisessa han-populaatiossa (Li ym. 2013).

4.4.9 Polymorfismi c.781A>G

P-glykoproteiinin c.781A>G-polymorfismi aiheuttaa isoleusiinin muuttumisen valiiniksi 261. aminohappotähteessä. Tätä polymorfismia on havaittu vain afrikkalaista alkuperää olevissa populaatioissa (Wolking ym. 2015). Ugandalaisissa sen yleisyys on jopa 6,9 % (Mukonzo ym. 2010). Tutkittaessa p-glykoproteiininvarianttien vaikutusta kiniinin plasmakonsentraatioon ugandalaisista koostuvassa tutkimusaineistossa, saatiin viitteitä siitä, että c.781A>G-variantilla saattoi olla vaikutusta kiniinin plasmakonsentraatioon

koehenkilöillä, mutta tutkimusaineiston pienuuden takia tilastollista merkittävyyttä ei saatu osoitettua. Tästä variantista ei ilmeisesti ole julkaistu *in vitro* -tutkimusten tuloksia.

4.4.10 Polymorfismi c.2005C>T

Polymorfismi c.2005C>T aiheuttaa p-glykoproteiinissa 669. aminohapon vaihtumisen arginiinista kysteiiniksi (Sakurai ym. 2007). Polymorfismia on tavattu pelkästään afrikkalaisamerikkalaisessa populaatiossa, jossa sen esiintyvyys on 1 %. Polymorfismin c.2005C>T on havaittu aiheuttavan hiivasoluissa suurentuneen resistenssin daunorubisiinia ja doksorubisiinia kohtaan (EC₅₀-arvot noin 1,4-kertaisia verrattuna villityyppiin), mistä tutkijat päättelivät p-glykoproteiinin toiminnan tehostuneen polymorfismin vaikutuksesta (Jeong ym. 2007). Varianttiproteiini ilmentyi noin 1,3-kertaisesti verrattuna villityyppiin, mutta tutkijoiden mukaan ilmentymistaso ei ollut yhteydessä resistenssin muutokseen. Toisen tutkimusryhmän tutkimuksessa ei havaittu polymorfismin aiheuttavan merkittävää eroa villityyppiin verrattuna proteiinitason ilmentymisessä eikä kalseiini-AM:n tai BODIPY FL:n kuljetusaktiivisuudessa, mutta herkkyys syklosporiini A -inhibitiolle nousi c.2005C>T -variantissa noin 1,4-kertaiseksi villityyppiin verrattuna (Gow ym. 2008). Kolmannen tutkimusryhmän munuaisten tubulussoluilla tehtyjen sytotoksisuuskokeiden tuloksissa korostui muutosten substraattiriippuvaisuus: vinblastiinin ja vinkristiinin suhteen resistenssissä ei ollut merkittäviä eroja verrattuna villityyppiin, mutta paklitakselin ja etoposidin suhteen resistenssi oli noin nelinkertaisesti heikentynyt varianttiproteiinin omaavassa solukannassa verrattuna villityyppiin (Liu ym. 2010).

4.5 Polymorfismien merkitys sairauksien synnyssä

Koska monien sairauksien synnyssä ajatellaan olevan osuutta ympäristöstä peräisin olevilla vierasaineilla, on arveltu, että mekanismeilla, jotka osallistuvat näiden vierasaineiden poistamiseen elimistöstä, saattaisi olla merkitystä siinä, miksi toinen

yksilö saa tietyn sairauden, ja toinen ei. Tämän takia p-glykoproteiinin polymorfismien osuutta sairauksien syntyyn on myös tutkittu melko paljon. Seuraavissa osuuksissa kerrotaan asiasta tarkemmin Alzheimerin taudin, Parkinsonin taudin ja suolistosairauksien suhteen.

4.5.1 Alzheimerin tauti

Alzheimerin tauti on dementiaa aiheuttava aivorappeumatauti, jonka histopatologiseen taudinkuvaan liittyy beeta-amyloidipeptidin kerääntyminen aivokuoreen (Chai ym. 2020). Beeta-amyloidin tiedetään olevan p-glykoproteiinin substraatti, ja p-glykoproteiinin ilmentyminen ja toiminta on käänteisesti verrannollinen ikään ja Alzheimerin taudin esiintyvyyteen. Näiden seikkojen takia on arveltu, että p-glykoproteiini saattaa olla osallinen Alzheimerin taudin patofysiologiassa, ja niinpä myös p-glykoproteiinipolymorfismien yhteyttä Alzheimerin taudin syntyyn on tutkittu, erityisesti kolmen yleisimmän polymorfismin (c.1236C>T, c.2677G>T/A, c.3435C>T) suhteen.

Yhdeksästä tutkimuksesta tehdyssä meta-analyysissä c.3435C>T-variantti korreloi korkeamman Alzheimerin taudin riskin kanssa, kun taas c.2677G>T/A-variantit olivat yhteydessä pienempään Alzheimerin taudin riskiin (Zhong ym. 2016). Toisessa tutkimuksessa taas havaittiin homotsygoottisen 3435C-alleelin korreloivan suuremman Alzheimerin taudin riskin kanssa verrattuna homotsygoottiseen 3435T-alleeliin (Fehér ym. 2014). Valitettavasti näiden pääsiasiallisesti pienillä tutkimuspopulaatioilla tehtyjen tutkimusten tulokset ovatkin siis olleet keskenään ristiriidassa. Erään teorian mukaan taas vaikutus kohdistuisikin jo sairastuneiden yksilöiden taudin etenemiseen veri-aivoesteiden toiminnan heikkenemisen kautta, eikä terveiden yksilöiden taudin puhkeamiseen (Van Assema ym. 2012). Käyttämällä radioleimattua verapamiilia merkkiaineena PET-kuvauksessa (positron emission tomography) saatiin selville, että Alzheimer-potilailla T-alleelien esiintyminen yleisimmissä polymorfismikohdissa oli yhteydessä heikentyneeseen p-glykoproteiinitoimintaan veriaivoesteessä, kun taas terveillä kontroleilla polymorfismien ei havaittu vaikuttavan p-glykoproteiinin toimintaan veriaivoesteessä. P-glykoproteiinipolymorfismien mahdollinen yhteys Alzheimerin

taudin esiintyvyyteen vaatii laajamittaisempaa tutkimusta, ja mahdollisen yhteyden osoittamiseksi p-glykoproteiinin ilmentymistason ja kuljetusaktiivisuuden muutoksien todentaminen aivoissa polymorfismin vaikutuksesta on tärkeää (Chai ym. 2020).

4.5.2 Parkinsonin tauti

Parkinsonin tauti on aivorappeumatauti, jonka synnyssä arvellaan olevan osuutta sekä ympäristö- että geneettisillä tekijöillä (Zschiedrich ym. 2009). Koska p-glykoproteiinin tiedetään olevan tärkeässä roolissa aivojen suojaamisessa vierasaineilta, on p-glykoproteiinin ja sen perinnöllisten polymorfismien yhteyttä Parkinsonin taudin esiintyvyyteen tutkittu useissa tutkimuksissa. Useimmissa ei kuitenkaan ole yleistä assosiaatiota löydetty. Sen sijaan tutkittaessa polymorfismeja populaatioissa, jotka ovat altistuneet hyönteismyrkyille, on polymorfismien todettu todennäköisesti yhdessä ympäristötekijöiden kanssa altistavan Parkinsonin taudille. Zschiedrich ym. (2009) havaitsivat 3435T-alleelin esiintyvyyden eroavan merkitsevästi Parkinson-potilaiden joukossa, jotka olivat altistuneet hyönteismyrkyille verrattuna altistumattomiin (89,5 % vs. 64,2 %;), todeten että T-alleeli kyseisessä kohdassa lisäsi riskiä Parkinsonin taudin puhkeamiseen hyönteismyrkkyaltistuksen jälkeen. Laajemmassa tutkimuksessa Narayan ym. (2015) tutkivat c.3435C>T- ja c.2677G>T/A-polymorfismien ja organokloriini- ja organofosforihyönteismyrkkyjen ammattialtistuksen välistä yhteyttä Parkinsonin taudin esiintyvyyteen eurooppalaisessa populaatiossa. Tutkimuksessa havaittiin homotsygoottisten varianttialleelien (T/T) kummassakin kohdassa olevan yhteydessä suurempaan Parkinsonin taudin riskiin ryhmässä, joka oli altistunut ammatillisesti hyönteismyrkyille. Sitä vastoin Ahmedin ym. (2016) meta-analyysissä havaittiin 1236T-alleelin olevan yhteydessä Parkinsonin taudin syntyyn. Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan otettu huomioon ympäristötekijöiden, kuten hyönteismyrkkyjen mahdollista osuutta, ja polymorfismeista tutkittiin vain c.1236C>T- ja c.3435C>T-polymorfismit, lisäksi jättäen huomiotta polymorfismien esiintyvyys haplotyyppeinä. Kaiken kaikkiaan p-glykoproteiinin polymorfismien osuudesta Parkinsonin taudin synnyssä on melko paljon viitteitä, yhdessä ympäristötekijöiden kanssa.

4.5.3 Suolistosairaudet

Koska p-glykoproteiinin tiedetään ilmentyvän suoliston epiteelillä ja rajoittavan vierasaineiden pääsyä epiteelin läpi, on p-glykoproteiinin ajateltu olevan potentiaalisesti merkittävä tekijä suolistosairauksien synnyssä. Tästä syystä myös p-glykoproteiinin polymorfismien yhteyttä tulehduksellisten suolistosairauksien syntyyn ja paksusuolen syövän syntyyn on tutkittu useissa tutkimuksissa (Andersen ym. 2015). Erityisesti on tutkittu yleisimpiä c.1236C>T-, c.2677G>T/A- ja c.3435C>T-polymorfismeja. Tulehduksellisten suolistosairauksien suhteen meta-analyysitutkimuksessa havaittiin 3435T-alleelilla olevan merkitsevä yhteys haavaisen paksusuolentulehduksen esiintyvyyteen, mutta Crohnin taudin kohdalla polymorfismien yhteyttä ei pystytty osoittamaan (Annese ym. 2006). Paksusuolen syövän suhteen tanskalaisessa tapauskohorttitutkimuksessa havaittiin 3435C-alleelin yhdessä lihan syönnin kanssa lisäävän paksusuolen syövän riskiä (Andersen ym. 2009). Sitä vastoin toisessa tutkimuksessa 3435C-alleelin havaittiin suojaavan paksusuolen syövän kehittymiseltä, mutta toistotutkimuksessa yhteyttä ei havaittu (Campa ym. 2012). P-glykoproteiinipolymorfismien mahdolliset vaikutukset suolistosairauksien syntyyn saattavat tulla esiin vain tietynlaisen ravintoaltistuksen yhteydessä, joten tulevat tutkimukset kannattaisi suunnitella tätä silmällä pitäen (Andersen ym. 2015).

4.6 P-glykoproteiinin perinnöllisen muuntelun kliininen merkitys

P-glykoproteiinin polymorfismien vaikutuksia lääkehoitojen suhteen ja sairauksien synnyssä on tutkittu monissa kliinisissä assosiaatiotutkimuksissa, ja lisäksi on tutkittu polymorfismien vaikutusta sekä p-glykoproteiinin funktionaaliseen aktiivisuuteen, että p-glykoproteiinin ilmentymistasoon. Joissakin tutkimuksissa on havaittu polymorfismien vaikuttavan ilmentymistasoon, mutta yleisesti ottaen ilmentymistasoa mittaavat tutkimukset ovat olleet keskenään niin ristiriidassa, että todennäköisesti yleistä säännönmukaisuutta ilmentymistason suhteen ei ole (Leschziner ym. 2007). Tämä ei kuitenkaan tarkoita, etteikö polymorfismi voisi vaikuttaa p-glykoproteiinin määrään jossain tietyssä kudoksessa, kuten esimerkiksi pohjukaissuolessa on havaittu c.3435C>T-

polymorfismin suhteen (Hoffmeyer ym. 2000). Toisaalta on pidettävä mielessä, että monissa tutkimuksissa ilmentymistasoa koskevat tutkimukset on tehty mRNA-tasolla, mikä ei välttämättä kerro koko totuutta asiasta, sillä proteiinin ilmentymisen säätelyyn liittyy myös monenlaisia transkriptionjälkeisiä vaiheita (Leschziner ym. 2007). Lisäksi p-glykoproteiinin ilmentymiseen vaikuttavat myös monet ympäristötekijät, samoin kuin itse sairaudet.

P-glykoproteiinipolymorfismien on osoitettu joissakin tutkimuksissa olevan yhteydessä tiettyjen lääkeaineiden suhteen lääkehoidon tehoon, oraalisesti annostellun lääkkeen biologiseen hyötyosuuteen, tai munuaisissa tapahtuvaan eliminaatioon. Tutkimustuloksia leimaa kuitenkin ristiriitaisuus, eivätkä tulokset minkään polymorfismin suhteen ole tähän mennessä olleet niin selkeitä, että p-glykoproteiinipolymorfismien perusteella voitaisiin antaa esimerkiksi lääkeannostuksen suhteen yksilöllisiä suosituksia (Wolking ym. 2015). Myöskään sairauksien patofysiologian suhteen p-glykoproteiinipolymorfismien merkitys ei ole selkeä, sillä esimerkiksi Alzheimerin ja Parkinsonin taudin synnyssä vaikuttavat todennäköisesti monet tekijät, joista osa on perinnöllisiä ja osa ympäristötekijöitä.

Kliinisten assosiaatiotutkimusten tulosten perusteella päätelmien tekeminen on haastavaa monista syistä. Potilasaineistojen etninen vaihtelevuus, sairaudet ja monilääkitys aiheuttavat lisämuuttujia tutkimuksiin. Useissa kliinisissä tutkimuksissa, joissa on löydetty yhteys tietyn p-glykoproteiinihaplotyyppin ja lääkeaineen tehon tai farmakokinetiikan välillä, ei p-glykoproteiiniaktiivisuutta ole kuitenkaan todennettu, jolloin syy-seuraus-yhteyttä ei voida luotettavasti osoittaa (Vivona ym. 2014). Monet p-glykoproteiinin polymorfismeista ovat lisäksi melko harvinaisia, mikä vaikeuttaa tilastollisen merkitsevyyden osoittamista, ja vaikutukset saattavat tulla esiin vain sellaisissa yksilöissä, jotka ovat homotsygootteja polymorfismin suhteen (Yee ym. 2018). Lisäksi tutkimustuloksien tulkintaa vaikeuttaa se, monet p-glykoproteiinin substraattit ovat muidenkin kuljetinproteiinien tai metaboliaentsyymien substraatteja. Esimerkiksi CYP3A4-entsyymillä ja p-glykoproteiinilla on paljon yhteisiä substraatteja (Wacher ym. 1995), ja lisäksi p-glykoproteiinin ja CYP3A4-entsyymien ilmentymisen säätelyn tiedetään olevan yhteydessä keskenään tumareseptorien kautta (Christians ym. 2005). Polymorfismien esiintyminen keskenään kytkentäepätasapainossa vaikeuttaa lisäksi johtopäätösten tekemistä yksittäisen polymorfismin vaikutuksista.

P-glykoproteiinipolymorfismin aiheuttamat vaikutukset esimerkiksi lääkeaineiden plasmapitoisuudessa ovat yleisesti ottaen huomattavasti pienempiä kuin esimerkiksi CYP450-entsyymien polymorfismien kohdalla (Lai ym. 2012). P-glykoproteiinipolymorfismien vaikutus seerumin plasmapitoisuuteen lieneekin olennainen lähinnä kapean terapeuttisen leveyden lääkkeillä, kuten digoksiinilla. Toisaalta on myös esitetty, että vaikutus oraalisen lääkkeenannon jälkeiseen biologiseen hyötyosuuteen saattaa tulla esiin, jos käytetään pienempiä lääkeannoksia, sillä suurilla lääkeannoksilla ohutsuolen epiteelin p-glykoproteiini saattaa olla saturoitunut (Keskitalo ym. 2009). Lisäksi on mahdollista, että verrattain pienet erot farmakokinetiikassa tulevat paremmin esiin monilääkityksessä (Keskitalo ym. 2008).

Huolimatta yleisesti melko pienestä vaikutuksesta lääkeaineiden seerumin plasmapitoisuuteen, p-glykoproteiinipolymorfismeilla saattaa olla suurempi merkitys sellaisten lääkeaineiden kohdalla, joiden vaikutuspaikka on solunsisäinen tai keskushermostossa (Lai ym. 2012). Joissakin tutkimuksissa on lisäksi saatu viitteitä siitä, että synonyymisten polymorfismien vaikutukset ovat suurempia sellaisissa kudoksissa, joissa p-glykoproteiinin ilmentyminen on suurempaa, mikä voi johtua siitä, että näissä olosuhteissa harvinaisen kodonin koodaama tRNA hupenee nopeammin (Aird ym. 2007, Kimchi-Sarfaty ym. 2007b). Mahdollisesti tällainen ero voisi tulla esiin esimerkiksi syöpäkudoksessa, sillä p-glykoproteiinin yli-ilmentymisen tiedetään olevan tavallista kasvaimissa. Samoin p-glykoproteiinipolymorfismeilla saattaa olla merkitystä esimerkiksi siinä, missä määrin sikiö altistuu istukan kautta tuleville vierasaineille (Hemauer ym. 2010).

Kaikenkaikkiaan vaikuttaa siltä, että p-glykoproteiinin ilmentymisessä ja toiminnassa ei-perinnöllisillä tekijöillä on suurempi vaikutus kuin perinnöllisillä tekijöillä, mutta perinnöllisilläkin tekijöillä lienee vaikutusta, eikä näistä tiedetä vielä tarpeeksi. Kansainvälinen transportterikonsortium ITC (International Transporter Consortium) suosittelee, että lisätutkimuksia laajemmilla tutkimusaineistoilla pitäisi tehdä, jotta tämän kuljetinproteiinin geneettisen muuntelun merkitys lääkeaineiden farmakokinetiikkaan ja lääkevasteeseen voitaisiin paremmin ymmärtää (Yee ym. 2018). Harvinaisemmilla varianteilla arvellaan olevan todennäköisemmin merkittäviä vaikutuksia proteiinin toimintaan kuin yleisemmin esiintyvillä, ja kuitenkin niitä on

tutkittu tähän mennessä melko vähän. Modernit genominlaajuiset tutkimusmenetelmät voivat auttaa valistuneiden valintojen tekemisessä tuleviin tutkimuksiin.

OSA II: KOKEELLINEN TUTKIMUS

5 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Perinnöllinen muuntelu lääkekuljetinproteiinien geeneissä voi aiheuttaa yksilöiden välillä eroja lääkeaineiden farmakokinetiikassa, mikä voi ilmetä esimerkiksi eroina lääkkeen tehossa tai haittavaikutuksissa (Wolking ym. 2015). Kuten tutkielman kirjallisuusosassa todettiin, p-glykoproteiinin polymorfismien vaikutuksia on tutkittu kliinisesti paljon, mutta tulokset ovat olleet ristiriitaisia. Lisäksi lääkeaineen farmakokinetiikkaan vaikuttavat ihmiselimistössä niin monet asiat, että havaitun ilmiön syy-seurausyhteyden osoittaminen tiettyyn polymorfismiin on vaikeaa. *In vitro* -tutkimuksilla pyritään saamaan selville juuri tietyn mutaation vaikutus proteiinin toimintaan ja ilmentymiseen samalla minimoiden muiden muuttujien vaikutus. Esimerkiksi solulinjan ja koeasetelman valinnalla pystytään hallitsemaan mahdollisten muiden kuljetinproteiinien tai metaboliaentsyymien aiheuttamaa vaikutusta paremmin kuin *in vivo* -tutkimuksissa. Harvinaisempien polymorfismien tutkimista kliinisissä aineistoissa vaikeuttaa myös se, että kolme yleisintä polymorfismia c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T esiintyvät populaatioissa yleisesti ja eri kombinaatioina (Fung ja Gottesman 2009), jolloin niiden vaikutusta on vaikea sulkea pois. *In vitro* -tutkimuksissa on mahdollista luoda tutkittavat mutaatiot haluttuun ”pohjaan” yleisimpien polymorfismien suhteen, jolloin mahdollinen nähtävä vaikutus voidaan paremmin yhdistää tutkittavaan mutaatioon.

Myös aiemmista *in vitro* -tutkimuksista on kuitenkin saatu ristiriitaisia tuloksia, mikä osittain voi johtua siitä, että polymorfismien vaikutukset näyttävät olevan usein substraattista riippuvaisia (Jeong ym. 2007, Woodahl ym. 2004, Dessilly ym. 2016a). Tämän takia *in vitro* -tutkimukset useilla erilaisilla substraateilla voivat tuoda lisää tietoa polymorfismien molekyyli-tason vaikutuksista, ja sitä kautta auttaa ymmärtämään polymorfismien kliinistä merkitystä. Aiempien tutkimustulosten ristiriitaisuus voi substraattiriippuvaisuuden lisäksi johtua myös esimerkiksi siitä, että tutkimuksia on tehty eri isäntäorganismeista peräisin olevissa soluissa. P-glykoproteiinia on ilmnennetty aiemmissa tutkimuksissa ihmissolujen lisäksi mm. hiivasoluissa (Jeong ym. 2007) ja hyönteissoluissa (Sakurai ym. 2007). Solukalvon lipidikoostumuksen tiedetään olevan

erilainen eri organismeissa (Shukla ym. 2012), ja p-glykoproteiinin toiminnan tiedetään olevan herkkä lipidikalvon koostumukselle (Sharom 2014). Lisäksi hiivasoluissa lääkeaineiden käsittelyn tiedetään olevan erilainen kuin ihmissoluissa (Fung ja Gottesman 2009), ja proteiinin translaationjälkeinen modifikaatio on puolestaan erilainen hyönteissoluissa verrattuna nisäkässoluihin (Brouwer ym. 2013, Shukla ym. 2012). Täten voidaan perustellusti sanoa, että ihmisen p-glykoproteiinin toiminnasta relevanteimpia tuloksia voidaan todennäköisesti saada ilmentämällä proteiinia ihmissoluissa.

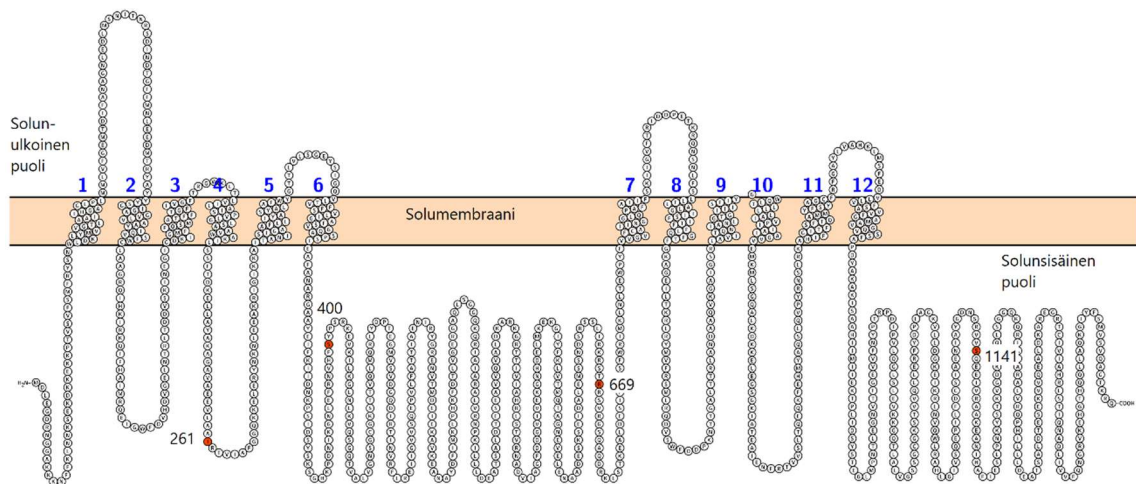
Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia viittä erilaista p-glykoproteiinin polymorfismia *in vitro*. Tutkimukseen valittiin mukaan sellaisia variantteja, jotka esiintyvät jossain etnisessä populaatiossa vähintään 1 %:n frekvenssillä, ja jotka aiheuttavat aminohappomuutoksen proteiinissa. Tällainen aminohapon vaihdokseen johtava muutos voi nykytietämyksen mukaan vaikuttaa suoraan proteiinin kolmiulotteiseen rakenteeseen ja sitä kautta aiheuttaa muutoksia proteiinin toiminnassa, esimerkiksi kuljetinproteiinin pumppaustehossa, substraatin sitoutumisessa tai lokalisaatiossa solumembraaniin (Kimchi-Sarfaty ym. 2007b). Tutkimukseen valitut polymorfismit on esitelty taulukossa 3. Valituista polymorfismeista yhdestä (c.781A>G) ei löytynyt lainkaan *in vitro* -tutkimusten tuloksia, muita polymorfismeja on tutkittu jo jonkin verran aiemmin. Täten tutkimuksella on mahdollisuus antaa myös aivan uutta tutkimustietoa, mutta aiempien tutkimustulosten eroavaisuuksien ja polymorfismivaikutusten substraateista riippuvaisen luonteen vuoksi on tervetullutta saada lisää tietoa myös jo aiemmin tutkituista polymorfismeista.

Taulukko 3. Tutkimukseen valitut p-glykoproteiinia koodaavan ABCB1-geenin variantit sekä niiden yleisyys populaatioissa. Tutkimukseen valittiin vähintään 1 %:n frekvenssillä jossain populaatiossa esiintyviä variantteja, joista aiheutuu aminohappomuutos proteiinissa.

Nukleotidimuutos	Aminohappomuutos	Yleisyys populaatiossa
c.781A>G	Ile261Val	1,5 % afrikanamerikkalaisissa ^[1]
c.1199G>A	Ser400Asn	12,9 % kaukasialaisissa ^[2]
c.1199G>T	Ser400Ile	2,3 % leukemiapotilaissa ^[3]
c.2005C>T	Arg669Cys	1 % afrikanamerikkalaisissa ^[2]
c.3421T>A	Ser1141Thr	11,1 % afrikanamerikkalaisissa ^[1]

Lähteet: [1] Wolking ym. 2015, [2] Sakurai ym. 2007, [3] Crouthamel ym. 2006

Valituista polymorfismeista kaikki sijaitsevat proteiinissa solumembraanin sytoplasmisella puolella: c.781A>G (I261V) sijaitsee transmembraanisegmenttien 4 ja 5 välisessä solunsisäisessä heliksissä, joka on vuorovaikutuksessa toisen nukleotidia sitovan domeenin kanssa; c.1199G>A/T (S400N/I) sijaitsee ensimmäisen nukleotidia sitovan domeenin välittömässä läheisyydessä, ja c.3421T>A (S1141T) sijaitsee toisen nukleotidia sitovan domeenin alueella (Kim ja Chen 2018). Polymorfismin c.2005C>T (R669C) tarkkaa sijaintia proteiinin kolmiulotteisessa kiderakenteessa ei puolestaan ole saatu selvitettyä, mutta se sijaitsee p-glykoproteiinin kahta puoliskoa yhdistävällä alueella. Kuvassa 3 on esitetty tutkimukseen valittujen polymorfismien sijainnit p-glykoproteiinin aminohappoketjussa.



Kuva 3. Tutkimukseen valittujen varianttien aminohappomuutosten sijainnit p-glykoproteiinissa. Kaikki polymorfismit sijaitsevat kalvoproteiinin solunsisäisellä puolella. Kuva on luotu käyttämällä Protter-verkkotyökalua (Omasits ym. 2014) ja proteiinisekvenssin perustana käytettiin UniProt-tunnusta P08183.

Tutkimukseen valitut mutaatiot päätettiin valmistaa yleisimpien polymorfismien (c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T) suhteen niin kutsuttuun villityyppihaplotyyppiin CGC, koska se on yleisin haplotyyppi afrikkalaista alkuperää olevissa populaatioissa (Fung ja Gottesman 2009), ja suurin osa tutkimukseen valituista polymorfismeista esiintyy nimenomaan afrikanamerikkalaisessa populaatiossa suurimmalla frekvenssillä. On kuitenkin huomattava, että yleisimpien polymorfismien muodostamien haplotyyppien esiintyvyys vaihtelee suuresti eri etnisissä ryhmissä. Esimerkiksi aasialaista alkuperää olevissa populaatioissa yleisin haplotyyppi on TTT, mikä kannattaisi huomioida, jos haluttaisiin tutkia näissä populaatioissa esiintyviä polymorfismeja. Tutkimukseen otettiin CGC-villityypin rinnalle vertailuhaplotyyppiksi myös TTT, koska näistä haplotyypeistä löytyy paljon aiempia tutkimustuloksia, joiden avulla voidaan arvioida tutkimusmenetelmien luotettavuutta.

Tutkimuksen osatavoitteina oli valmistaa edellä mainitut p-glykoproteiinivariantit, ilmentää niitä ihmissoluissa, optimoida ilmentymistä ja koeasetelmia, sekä vertailla eri varianttien ilmentymistasoa ja kuljetusaktiivisuutta villityyppiin. Koska haluttiin tutkia useampia polymorfismeja, oli perusteltua käyttää väliaikaisen proteiini-ilmentämisen menetelmää, jolloin voidaan ylläpitää vain yhtä solulinjaa, jossa kaikkia muutoksia voidaan tutkia rinnakkain. Tehokkaan kalvoproteiini-ilmentämisen tiedetään olevan

mahdollista bakulovirustransduktion avulla (Shukla ym. 2012). Lisäksi bakulovirustransduktio on bioturvallinen tapa ilmentää proteiineja, sillä bakulovirukset eivät kykene lisääntymään nisäkässoluissa. Solulinjaksi valikoitui ihmisen alkion munuaissoluista peräisin oleva solulinja HEK293 (human embryonic kidney cells 293), koska siinä tiedetään olevan matala endogeeninen kuljetinproteiinituotanto (Brouwer ym. 2013). HEK293-solujen tiedettiin lisäksi sopivan useampaan erilaiseen koeasetelmaan, kuten vesikkelikuljetuskokeisiin (Gozalpour ym. 2013) ja akkumulaatiokokeisiin (Gow ym. 2008). P-glykoproteiinin polymorfismien tiedetään aiheuttavan usein substraalista riippuvaisia vaikutuksia, joten tästä syystä tutkimukseen haluttiin ottaa vähintään kaksi erilaista substraattia hyödyntävää koeasetelmaa ja optimoida niitä.

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Yleisimpien haplotyyppien ja p-glykoproteiinivarianttien mutageneesi pENTR-kantajaplasmidissa

Tutkittavat polymorfismit sisältävät varianttigeenikonstruktit valmistettiin *ABCB1*-geeniin kohdennetulla mutageneesillä, suorittamalla polymeraasiketjureaktio (PCR) halutun mutaation sisältävillä alukkeilla. Aluksi p-glykoproteiinia koodaava *ABCB1*-geeni pENTR-kloonausvektorissa (Gozalpour ym. 2013) siirrettiin lämpöshokkitransformaation (5 ng plasmidia, 42 °C, 30 s) avulla 50 µl:aan kaupallisia kompetentteja Neb®5α-bakteerisoluja (New England Biolabs). Bakteereita kasvatettiin 24 h nestekasvatuksessa 30 °C lämpötilassa 225 rpm ravistuksessa LB-kasvatusliuoksessa (Luria-Bertani -liuos: 1% tryptoni, 0,5% hiivauute, 0,5% NaCl) kanamysiinin 50 µg/ml läsnäollessa. Plasmidi eristettiin Nucleospin® Plasmid EasyPure -menetelmällä (Macherey-Nagel). *ABCB1*-geenin läsnäolo plasmidissa varmistettiin ensin PCR:n avulla *ABCB1*-spesifisillä alukkeilla, sekä myöhemmin geenisekvenssin oikeellisuus varmistettiin sekvensoimalla se (EuroFins Genomics), ja vertaamalla sekvenssiä p-glykoproteiinin geenisekvenssiin, joka oli saatu Embl-tietokannasta tunnisteella M14758

(<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/M14758>). Kyseinen tietokannan sekvenssi kuitenkin sisältää spontaanin mutaation kohdassa G185V, joten tältä osin saamamme geenin sekvenssi erosi vertailusekvenssistä ja sisälsi villityypin alleelin, kuten olikin tarkoituksenmukaista. Sekvenssien vertailu tutkimuksen aikana suoritettiin Benchling-verkkotyökalun avulla (www.benchling.com).

Sekvensoinnin tuloksena havaittiin, ettei saatu *ABCB1*-geenisekvenssi ollut yleisimpien kolmen polymorfismin (c.1236C>T, c.2677G>T/A ja c.3435C>T) suhteen kumpaakaan yleisimmistä haplotyypeistä (CGC tai TTT), vaan *ABCB1*-geenin haplotyyppi alkuperäisessä plasmidissa oli CTT. Tästä syystä kohdennetulla mutageneesilla lähdettiin ensin valmistamaan villityyppiä CGC ja toista yleistä haplotyyppiä TTT. CTT mutatoitiin TTT:ksi tekemällä kohdennettu mutaatio C>T 1236. nukleotidiin. CGC valmistettiin CTT-haplotyypistä mutatoimalla ensin 3435. nukleotidi T>C, jolloin saatiin välivaihe CTC, ja tämän jälkeen 2677. nukleotidiin tehtiin mutaatio T>G, jolloin saatiin villityypin haplotyyppi CGC. Tämän jälkeen lähdettiin mutatoimaan varsinaisia tutkittavia variantteja CGC-villityyppiin.

Halutun mutaation sisältävät alukkeet (Taulukko 4) PCR:n avulla tehtävää kohdennettua mutageneesia varten suunniteltiin Embl-tietokannan sekvenssin numero M14758 pohjalta. Lukuunottamatta c.2677T>G-mutaatiota kaikkien alukkeiden suunnittelussa käytettiin apuna NEBaseChanger[®]-verkkotyökalua (New England Biolabs, <https://nebasechanger.neb.com/>) ja mutaatiot toteutettiin Q5[®] Site-directed Mutagenesis -protokollan (New England Biolabs) mukaisesti alukkeilla, joiden 5'-päät osuvat vastakkain (back-to-back). Villityypin GCG luomisessa käytetty c.2677T>G-mutaatio toteutettiin päällekkäin menevillä (overlapping) alukkeilla, jotka suunniteltiin PrimerX-työkalulla (<https://www.bioinformatics.org/primerx/>).

Polymeraasiketjureaktiot toteutettiin Bio-Rad T100 Thermal Cycler -laitteessa. Kuhunkin back-to-back-alukkeilla toteutettuun 25 µl:n reaktioon laitettiin 0,5 yksikköä Q5[®] High-Fidelity DNA-polymeraasientsyymiä (New England Biolabs), 5 µl 5-kertaista Q5-reaktiopuskuria (New England Biolabs), 5 nmol dNTP-sekoitusta, 12,5 pmol F- ja R-alukkeita (Oligomer, Saksa) ja 1 ng templaatti-DNA:ta. Reaktiossa oli 25 monistussykliä, ja reaktion jälkeen PCR-tuotteet käsiteltiin Q5[®] Site-Directed Mutagenesis -protokollan mukaisesti KLD[®]-entsyymisekoituksella (New England

Biolabs) rengasmaisen plasmidin muodostamiseksi ja templaatti-DNA:n hajottamiseksi. Päällekkäisillä alukkeilla toteutettuun c.2677T>G-mutaation 25 µl:n reaktioon templaatti-DNA:ta laitettiin 20 ng ja F- ja R- alukkeita kumpaakin 5 pmol ja monistamissyklejä oli 12. Muuten reaktio toteutettiin vastaavasti kuin back-to-back-alukkeiden kohdalla. PCR-reaktiossa syntynyt tuote käsiteltiin 10 yksiköllä *DpnI*-entsyymiä (New England Biolabs) tunnin ajan 37 °C:ssa templaatti-DNA:n hajottamiseksi. Varianttiplasmit transformoitiin lämpöshokkitransformaation avulla NEB® 5α-bakteereihin ja nestekasvatuksen jälkeen niistä eristettiin plasmidi-DNA. Plasmidin oikea koko varmistettiin restriktioanalyysin avulla *EcoRV HF* -entsyymillä, minkä jälkeen sekvenssin oikeellisuus varmistettiin sekvensoimalla ensin mutaatiokohta ja sitten koko *ABCB1*-geeni.

Taulukko 4. Villityypin CGC, TTT-haplotyyppin ja tutkittavien varianttien valmistamisessa kohdennetussa mutageneesissa käytetyt PCR-alukkeet, sekä alukkeiden kiinnittymisvaiheen lämpötilat (T_a).

Haluttu mutaatio	Käytetyt alukkeet (mutaatiokohta korostettu)	T _a
c.3435T>C	F: AGGAAGAGAT <u>C</u> GTGAGGGCAGCAAAG R: TCTTGAAGGGTCTGAACCTGA	69,0 °C
c.2677T>G	F: GAAAGAACTAGAAGGT <u>G</u> CTGGGAAGATCGCTAC R: GTAGCGATCTTCCCAG <u>C</u> ACCTTCTAGTTCTTTC	68,0 °C
c.1236C>T	F: TCTTGAAGGGT <u>T</u> CTGAACCTGA R: TCTTAACTTCTTTTCGAGATGG	60,0 °C
c.1199G>T	F: GTTCACTTCA <u>T</u> TTACCCATCTC R: ATTTCTGAATTCCAAATTTCCC	57,4 °C
c.1199G>A	F: GTTCACTTCA <u>A</u> TTACCCATCTC R: ATTTCTGAATTCCAAATTTCCC	58,7 °C
c.781A>G	F: CTTGGCAGCA <u>G</u> TTAGAACTGTG R: ACCTCTTCAGCTACTGCT	62,7 °C
c.2005C>T	F: AAGATCAACT <u>T</u> GTAGGAGTGTC R: TTTCTTATTAGACTGGATCTTG	57,9 °C
c.3421T>A	F: CCGGGTGGTG <u>A</u> CACAGGAAGA R: CTGTTGTCTCCATAGGCAATG	64,0 °C

6.2 Soluviljely

Sf9-hyönteissoluja (*Spodoptera frugiperda*) käytettiin p-glykoproteiinia koodaavan *ABCB1*-geenin sisältävien bakulovirusten tuottamiseen ja vahvistamiseen. Soluja kasvatettiin adherenttien solujen kasvatukseen tarkoitetuissa polystyreenisoluviljelypulloissa 27 °C:ssa HyClone SfX Insect -elatusnesteessä (ThermoFisher Scientific), joka oli täydennetty lisäämällä 5 % naudan sikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS). Solut jaettiin, kun ne olivat saavuttaneet noin 90 % konfluenssin.

HEK293-soluja käytettiin p-glykoproteiinin väliaikaiseen ilmentämiseen bakulovirustransduktion avulla. HEK293-soluja ylläpidettiin adherenttien solujen kasvatukseen tarkoitetuissa polystyreenisoluviljelypulloissa DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) + High Glucose, Glutamax™, HEPES -elatusnesteessä (Gibco 32430, ThermoFisher Scientific), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia, 37 °C:n lämpötilassa ja 5%:n CO₂-pitoisuudessa. Solut jaettiin, kun ne olivat noin 80–90 % konfluenteja. Tutkimuksen aikana käytettyjen HEK293-solujen jakokertojen määrä oli 30–42.

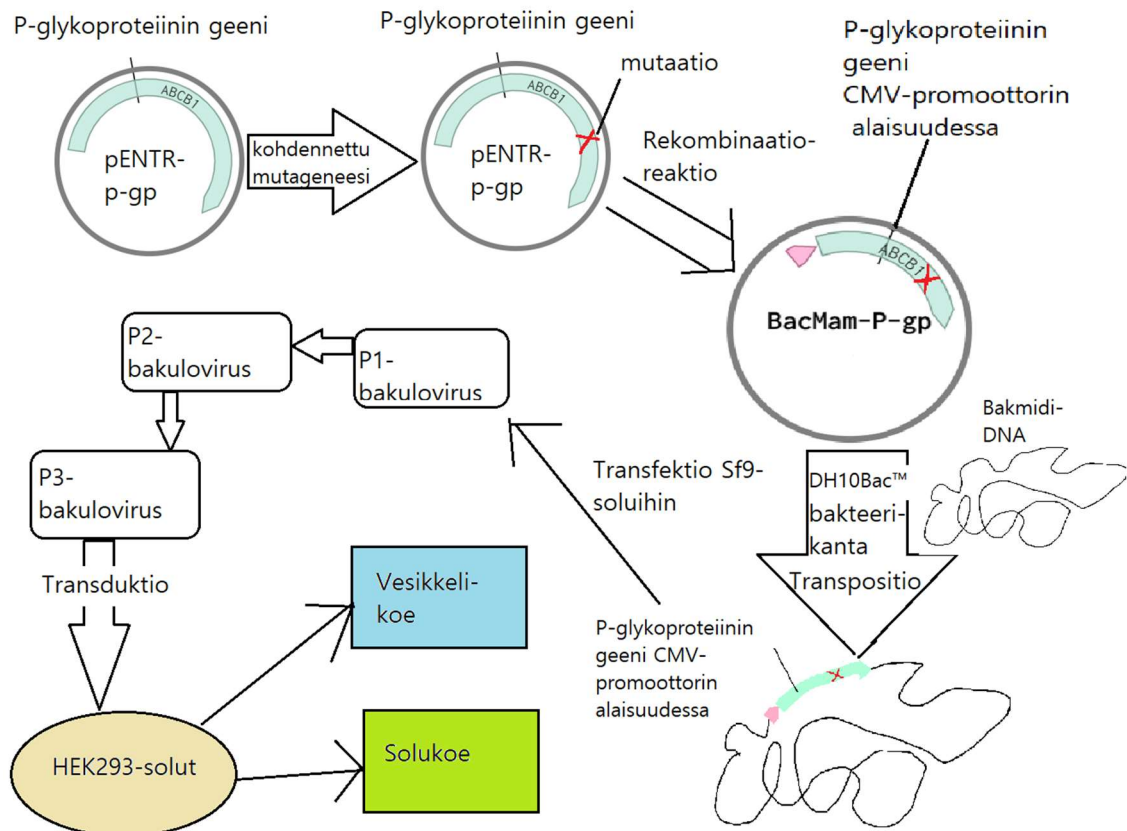
6.3 P-glykoproteiinibakulovirusten tuottaminen Sf9-soluissa

ABCB1-geenin ilmentämiseksi HEK293-soluissa hyödynnettiin bakuloviruksiin perustuvaa Bac-to-Bac® rekombinanttiproteiinien ilmentämisprotokollaa (Invitrogen), joka oli muokattu nisäkässoluihin sopivaksi. Tutkittavien mutaatioiden toteuttamisen jälkeen variantti-*ABCB1*-geenit siirrettiin BacMam-vektoriin, joka sisältää oikeanlaisen promoottorin geenituotteen ilmentämiseen nisäkässoluissa. Tämä tehtiin Gateway Cloning -menetelmän (Invitrogen) avulla. Menetelmässä tapahtuu rekombinaatioreaktio pENTR-luovuttajavektorin ja vastaanottajavektorin BacMam-VSV-Dest (El-Sheikh ym. 2008) välillä LR Clonase® II -entsyymien avulla. 10 µl:n LR-reaktioon laitettiin 2 µl LR clonase® II -entsyymisekoitusta (Invitrogen), ja sekä luovuttaja- että vastaanottajavektoria laitettiin LR-reaktioseokseen 150 ng. LR-reaktion annettiin jatkua

yön yli 25 °C:ssa, ja reaktio pysäytettiin lisäämällä 1 µl Proteinase K-liuosta (Invitrogen) ja inkuboimalla 10 min 37 °C:ssa. 1 µl LR-reaktioseosta transformoitiin lämpöshokkitransformaation (42 °C, 30 s) avulla Neb[®]5α-soluihin, ja oikeanlaiset pesäkkeet valikoitiin ampicilliiniselektion avulla antaen pesäkkeiden kasvaa 24 tuntia 30 °C:ssa 100 µg/ml ampicilliinia sisältävillä maljoilla. P-glykoproteiini-BacMam-plasmidit eristettiin, ja restriktioanalyysin avulla varmistettiin, että BacMam-vektoriin oli liittynyt oikean kokoinen insertti.

Tämän jälkeen *ABCB1*-BacMam-plasmidit transformoitiin DH10Bac[™] *E.coli* -bakteerikantaan. DH10Bac[™] -solut sisältävät bakmidin eli bakuloviruksen genomia, jonka avulla bakulovirukset lisääntyvät hyönteissoluissa. Sellaisenaan bakmidissa ei ole sopivaa promoottoria proteiinin ilmentämiseen nisäkässoluissa, mutta kun *ABCB1*-BacMam-plasmidi transformoidaan DH10Bac[™]-soluihin, tapahtuu niissä transpositioreaktio *ABCB1*-BacMam-plasmidin ja bakmidin välillä siten, että syntyvässä rekombinanttibakmidissa on haluttu *ABCB1*-geeni nisäkäspromoottorin säätelyn alaisuudessa. 250 ng kutakin *ABCB1*-BacMam-plasmidia transformoitiin lämpöshokkitransformaation (42 °C, 45 s) avulla 100 µl:aan DH10Bac[™]-soluja. Rekombinanttibakmidit valikoitiin kasvattamalla transformantteja 48–72 h valolta suojattuna LB-agar-maljoilla, jossa oli selektiota varten 50 µg/ml kanamysiiniä, 7 µg/ml gentamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä, 100 µg/ml 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktopyranosidia (X-gal) sekä 40 µg/ml isopropyylitio-β-galaktosidia (IPTG). DH10Bac[™] -bakteerikanta ei pysty yksinään tuottamaan funktionaalista β-galaktosidaasia, mutta bakteerin sisältämä bakmidi puolestaan sisältää LacZα-peptidigeenin, jonka avulla bakteerin tuottama vajavainen β-galaktosidaasientsyymi tulee aktiiviseksi, ja tämä näkyy sinisen väriaineen tuottamisena värittömästä X-gal-lähtöaineestä. Sitä vastoin kun bakmidiin siirtyy geeni-insertti, aiheuttaa tämä bakmidissa olevan LacZα-geenin katkeamisen, minkä takia rekombinanttibakmidin sisältävät bakteerit eivät pysty tuottamaan sinistä väriainetta, vaan syntyvät pesäkkeet ovat valkoisia. Maljoilta valikoitiin siksi suurimmat valkoiset pesäkkeet, ja niistä eristettiin rekombinanttibakmidi-DNA emäksiseen hajotukseen perustuvalla menetelmällä (Bac-to-Bac[®] protokolla, versio D). Rekombinanttibakmideista varmistettiin *ABCB1*-geenin läsnäolo PCR:n avulla *ABCB1*-spesifisillä alukkeilla, ja insertin oikea koko insertin ulkopuolelle bakmidiin kiinnittyvillä alukkeilla.

Rekombinanttibakmidi, joka sisälsi nyt halutun *ABCB1*-geenin, transfektoitiin Sf9-soluihin, jolloin Sf9-solut alkoivat tuottamaan *ABCB1*-geenin sisältäviä bakulovirusia. Bakulovirusia vahvistettiin tekemällä Sf9-transfektio yhteensä 3 kertaa, ja näin saatiin P3-sukupolven bakulovirus, jota käytettiin HEK293-solujen transdusoimiseen. P-glykoproteiini alkaa virustransduktion seurauksena tuottaa HEK293-soluissa, mutta itse virukset eivät kykene lisääntymään nisäkässoluissa. Rekombinanttiproteiinien tuottamisen prosessi on kokonaisuudessaan esitelty kuvassa 4.



Kuva 4. P-glykoproteiinivarianttien ilmentäminen HEK293-soluissa. Mutaatiot *ABCB1*-geeniin suoritettiin kohdennetulla mutageneesillä pENTR-plasmidissa. Seuraavaksi *ABCB1*-geeni siirrettiin BacMam-vektoriin, jolloin se päätyi nisäkäspromootorin alaisuuteen. DH10Bac™ bakteerikannassa geeni promootoreineen siirtyi osaksi bakuloviruksen genomia eli bakmidia. Bakulovirukset lisääntyivät ja vahvistuivat Sf9-soluissa. P3-sukupolven bakulovirusia käytettiin HEK293-nisäkässolujen transduktioon, jolloin varianttiproteiini alkoi ilmentyä HEK293-soluissa. Transdusoituja soluja käytettiin kalseiininkertymiskokeeseen ja vesikkelien valmistukseen vesikkelikuljetuskoetta varten.

Bakmiditransfektio suoritettiin 25 cm² soluviljelypulloissa, joihin 2,5 miljoonan Sf9-solun oli annettu kiinnittyä tunnin ajan ennen transfektiota. Transfektioseokset tehtiin seerumittomaan elatusnesteeseen 400 µl:n tilavuuteen, ja kuhunkin transfektioon

käytettiin 8 µl bakmidi-DNA:ta sekä 12 µl transfektiotehokkuutta parantavaa Cellfectin II-reagenssia (ThermoFisher Scientific). Bakmidi-DNA:n määrä koeolosuhteiden optimoinnissa käytettyjen CTT-haplotyyppin virusten tuottamisessa oli 15-19 µg, kun taas myöhemmässä vaiheessa tuotettujen CGC- ja TTT-haplotyyppien ja varsinaisten varianttiproteiinien tuottamisessa bakmidi-DNA:n määrä vakioitiin 4 µg:aan. Jotta transfektion vaikutuksia solujen kasvussa ja ulkonäössä pystyttiin seuraamaan, kontrollina käytettiin soluja, joita käsiteltiin muutoin samoilla liuoksilla, mutta ”transfektioseos” ei sisältänyt bakmidia. Cellfectin II -reagenssin kationisten lipidien ja bakmidi-DNA:n annettiin 30 minuutin ajan kompleksoitua ennen transfektioseoksen lisäämistä soluihin. Transfektioseoksen lisäämisen jälkeen soluja inkuboitiin 5 tuntia 27 °C:ssa, minkä jälkeen seerumiton elatusneste ja transfektioseos poistettiin pulloista, tilalle vaihdettiin seerumillinen elatusneste, ja soluja inkuboitiin 27 °C:ssa. Ensimmäisen sukupolven P1-virukset kerättiin 7 vuorokauden kuluttua irrottamalla solut, sentrifugoimalla huoneenlämmössä 3000 g 5 minuutin ajan, ja keräämällä saatu supernatantti.

Toisen sukupolven P2-virus valmistettiin transfektoimalla 75 cm²:n soluviljelypullossa 7,5 miljoonaa Sf9-solua P1-viruksella (2 µl/cm²), inkuboimalla soluja 27 °C:ssa ja keräämällä P2-virus 7 vuorokauden kuluttua jälleen samalla tavoin kuin aiemmin. P3-virus valmistettiin vastaavasti transfektoimalla Sf9-solut P2-viruksella ja keräämällä virus jälleen 7 vuorokauden kuluttua. Kaikki virukset säilytettiin +4 °C:ssa valolta suojattuna. P3-virusta käytettiin HEK293-solujen transdusoimiseen vesikkelikuljetus-, kalseiininkertymis- ja Western blot -koetta varten. Myös P4-viruksen valmistamista kokeiltiin transduktio-olosuhteiden optimoinnissa, siten että P4-virus kerättiin 5 vuorokauden kuluttua transfektiosta.

Tutkimuksen varsinainen tavoite oli tutkia p-glykoproteiinin geenivarianttien ilmentymistä ja aktiivisuutta verrattuna CGC-villityyppiin. Koska saatu alkuperäinen *ABCB1*-geenisekvenssi oli kuitenkin yleisimpien kolmen polymorfismin suhteen muu kuin villityyppi, alettiin ensimmäisenä HEK293-soluissa ilmentää CTT-haplotyyppiä, jotta proteiinin ilmentymistä sekä käytettäviä koemenetelmiä päästiin optimoimaan.

6.4 Vesikkelien valmistaminen *ABCB1*-transdusoiduista HEK293-soluista

Membraanivesikkeleitä valmistettiin transduktio-olosuhteiden optimoimista varten CTT-haplotyyppin bakuloviruksilla transdusoiduista HEK293-soluista. 10 miljoonaa solua istutettiin 175 cm² solukasvatuspulloihin, ja 24 tunnin kuluttua tästä solut transdukoitiin P3-bakuloviruksella. Transduktiossa käytetty P3-bakulovirusmäärä oli 20 µl/cm², ja transduktiotehokkuutta lisäävän natriumbutyraatin konsentraatio transduktiossa oli 5 mM tai 10 mM. 72 tunnin kuluttua transduktiosta p-glykoproteiini-transdusoidut HEK293-solut kerättiin vesikkelien valmistusta varten. Solut irrotettiin kasvatuspulloista ja sentrifugoitiin 3000 g 4 °C:ssa 15 minuutin ajan. Solupelletit suspensoitiin 10 ml:aan TS-puskuria (10mM Tris, 250mM sakkaroosi, pH 7,4), minkä jälkeen solut homogenisoitiin käyttämällä Dounce-homogenisaattoria B-survimella 40 vetoa. Hajotettuja soluja sentrifugoitiin 4000 g 20 minuuttia 4 °C:ssa ja supernatantti siirrettiin uusiin putkiin, minkä jälkeen sentrifugoitiin 1 h 45 min ajan 21 000 g. Pelletit suspensoitiin 300 µl:aan TS-puskuria ja näytteet homogenisoitiin vetämällä suspensio 10 kertaa 27 G neulan läpi. Tämän jälkeen näytteiden proteiinimäärä mitattiin Bradfordin menetelmällä. Standardikäyrä muodostettiin käyttämällä eri vahvuisia BSA-liuoksia (naudan seerumin albumiini) ja Coomassie[®] Protein Assay Reagent -liuosta (ThermoFisher Scientific) ja kolorimetrinen reaktio näytteissä detektoitiin mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 595 nm. Vesikkelinäytteet vakioitiin samaan kokonaisproteiinimäärään 1,5 mg/ml laimentamalla näytteet TS-puskuriin.

6.5 Vesikkelikuljetuskoe p-glykoproteiiniaktiivisuuden määrittämiseksi

Vesikkelikuljetuskoe on yleisesti käytetty tutkimusmenetelmä solukalvojen kuljetinproteiineja tutkittaessa. Vesikkelit muodostuvat spontaanisti soluista eristetyistä solukalvoista, jolloin osa niistä muodostuu nurinperin, ja tässä tapauksessa p-glykoproteiini kuljettaa substraattia sisään- eikä ulospäin (Brouwer ym. 2013). Substraatit ja muut kofaktorit voidaan tällöin lisätä suoraan reaktioseokseen, ja kuljetettu aine kerääntyy vesikkelien sisään, josta sen määrä voidaan mitata. Vesikkelikokeessa käytettävän substraatin pitää olla melko vesiliukoinen, koska liian lipofiilinen substraatti

diffundoituksi ulos vesikkeleistä, sekä voisi sitoutua solukalvoon. Kuten kirjallisuusuudessa (luku 3.1) todettiin, useimmat p-glykoproteiinin substraatit ovat melko lipofiilisiä, eivätkä siten sovellu optimaalisesti käytettäväksi tässä kokeessa. Tästä syystä substraatiksi valikoitui melko hydrofiilinen n-metyylikinidiini (NMQ), jonka tiedettiin sopivan substraatiksi kyseiseen koeasetelmaan (Gozalpour ym. 2013).

Vesikkelikuljetuskokeen avulla vertailtiin p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuutta CTT-haplotyyppin p-glykoproteiinivesikkeleissä, joiden transduktiossa oli käytetty 5 tai 10 mM natriumbutyraattipitoisuutta. Negatiivisena kontrollina käytettiin vesikkeleitä, jotka tuotettiin transdusoimalla solut EYFP-geenin (enhanced yellow fluorescence protein) sisältävillä P3-bakuloviruksilla. Positiivisena kontrollina p-glykoproteiinivälitteisestä kuljetuksesta käytettiin HEK293-soluissa tuotettuja p-glykoproteiinivesikkeleitä (PharmTox, Nijmegen, Alankomaat). P-glykoproteiinin toiminta vaatii energialähteeksi ATP:tä, joten ATP-välitteinen kuljetus voitiin erottaa mahdollisesta muusta kulkeutumisesta käyttämällä kontrollina AMP:ta (adenosiinimonofosfaatti) ATP:n sijaan. Kokeet suoritettiin kolmella rinnakkaisnäytteellä. Koe suoritettiin 96-kuoppalevyllä, johon pipetoitiin 10 µl kokonaisproteiinipitoisuuteen 1,5 mg/ml laimennettuja vesikkeleitä. Kaivoihin lisättiin 20 µl 37 °C:een esilämmitettyä reaktioseosta, joka sisälsi NMQ-substraatin ja AMP:n tai ATP:n, siten että käytetyn NMQ:n lopullinen pitoisuus kuljetusreaktiossa oli 2 µM, sekä ATP:n tai AMP:n lopullinen pitoisuus oli 4 mM. Kuljetusreaktion annettiin edetä 37 °C:ssa ravistelijassa 3 minuutin ajan, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä 150 µl jääkylmää TS-puskuria, ja kuoppien sisältö siirrettiin TS-puskurilla esikostutetulle 1,0 µm 96-kuoppaiselle suodatinlevylle (Merck Millipore MultiSreen® HTS, tuotenumero MSFBN6B50). Suodatinlevyyn siirretyt näytteet pestiin kaksi kertaa 200 µl:lla jääkylmää TS-puskuria, jolloin vesikkelit jäivät suodatinlevyyn muiden reagenssien peseytyessä pois. Suodatinlevy kuivatettiin alipaineen avulla, ja vesikkelinäytteet eluoitiin suodatinlevystä inkuboimalla niitä 30 minuutin ajan seoksen kanssa, joka sisälsi 3:1 metanoli-vesiseosta ja 0,1 % muurahaishappoa, ja sentrifugoimalla levyä 2 minuutin ajan 3220 g +4 °C:ssa. NMQ:n määrä vesikkeleissä määritettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografian avulla (HPLC, high performance liquid chromatography) Agilent 1100 -laitteistolla, joka oli yhdistetty fluoresenssidetektoriin. Yhdisteet näytteessä eroteltiin 2,7 µm partikkelikoon Poroshell 120 EC-C18 -käänteisfaasikolonnin avulla pitäen kolonnin lämpötila 40 °C:ssa

ja injektio-tilavuuden ollessa 10 µl. Fluoresenssidetektorin eksitaatioaallonpituutena käytettiin 248 nm ja emissioaallonpituutena 442 nm.

HPLC-piikin pinta-aloista laskettiin keskiarvo (3 rinnakkaismittausta) ja keskihajonta. Tuloksille suoritettiin tilastollinen analyysi Graphpad Prism 9 -ohjelmiston avulla verraten kunkin vesikkelin kohdalla ATP- ja AMP-arvoja, käyttäen paritonta parametrista t-testiä ja 1 % virheellisten löydösten osuutta.

6.6 Ilmentymistason määrittäminen Western blot -kokeen avulla

Western blot -menetelmällä pyrittiin saamaan selville, oliko HEK293-soluissa mahdollista taustasignaalia aiheuttavaa endogeenistä p-glykoproteiinituotantoa, vaikuttivatko transduktio-olosuhteet ilmentyvän p-glykoproteiinin määrään, sekä oliko ilmentyvän p-glykoproteiinin määrä solukalvolla varianteissa erilainen verrattuna villityyppiin. Western blot -näytteiden kokonaisproteiinimäärä kussakin näytteessä vakioitiin, jotta nähtävät erot johtuisivat eroista p-glykoproteiinin määrässä.

Western blot -näytteitä varten soluja istutettiin 6-kuoppalevyihin (Sarstedt) ja 24 tunnin kuluttua istuttamisesta suoritettiin virustransduktio halutuissa olosuhteissa. Transduktio-olosuhteita optimoidessa tutkittiin natriumbutyraatin pitoisuuden (2,5 mM, 5 mM tai 10 mM) sekä transduktiossa käytetyn virusmäärän (10 tai 20 µl/cm²) vaikutusta soluissa ilmentyvän p-glykoproteiinin (CTT-haplotyyppi) määrään, käytetyn solutiheyden ollessa 0,51 miljoonaa solua/kuoppa. Lisäksi kokeiltiin, saadaanko parempi transduktioteho lisäämällä butyraatti samaan aikaan viruksen kanssa, vai kuusi tuntia viruksen jälkeen.

Verrattaessa variantteja villityyppiin soluja istutettiin 0,306 miljoonaa solua per kuoppa (34500 solua/cm²), transduktiossa käytettiin 20 µl/cm² virusmäärää ja 10 mM natriumbutyraattipitoisuutta. Negatiivisena kontrollina käytettiin EYFP-viruksella sekä pelkällä natriumbutyraatilla transdusoituja soluja. 48 tunnin kuluttua transduktiosta solut kerättiin imemällä kuopista elatusneste pois ja irrottamalla solut pipetoimalla 1 ml:aan PBS-puskuria. Soluja sentrifugoitiin 4000 g 15 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen solupelletit suspensioitiin hajotuspuskuriin (50 mM Tris-HCl, 0,5 % Triton-X 100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) käyttäen puskuria noin 2–3-kertaisen määrän pelletin kokoon

nähdessä. Hajotusreaktion annettiin edetä jäällä 30 minuuttia välillä sekoittaen. Lysaattia sentrifugoitiin 10 000 g 20 minuutin ajan 4 °C:ssa, minkä jälkeen supernatantti kerättiin, ja proteiinikonsentraatio määritettiin Bradfordin menetelmällä. Näytteet laimennettiin hajotuspuskuriin 2,67 mg/ml pitoisuuteen. Näytteet valmistettiin lisäämällä 15 µl:n näytemäärään 5 µl 4X näytepuskuria, johon merkaptoetanolia oli lisätty 10% (Bio-Rad Laemmli sample buffer). Näytteistä 10 µl pipetoitiin Bio-Rad TGX Stain free gel 4–20% -geelille, eli proteiinin kokonaismäärä kaivoa kohden oli 20 µg. Kokostandardina proteiininäytteille käytettiin 5 µl 10–250 kDa proteiinistandardia PageRuler plus™ (ThermoFisher Scientific). Näytteen proteiinit eroteltiin koon mukaan ajamalla niitä geeliin 200 V jännitteellä noin 40 minuutin ajan Laemmli-ajopuskurissa (0,3 % Tris, 1,44 % glysiini, 0,1 % SDS) minkä jälkeen proteiinit siirrettiin 0,2 µm nitroselluloosamembraanigeelille (Bio-Rad) Trans-Blot Turbo Transfer System -laitteen (Bio-Rad) avulla. Ennen vasta-ainekäsittelyitä vasta-aineiden mahdollinen epäspesifinen sitoutuminen minimoitiin inkuboimalla membraania tunnin ajan 5 % rasvattomassa maitoliuoksessa, joka oli tehty TBST-puskuriin (0,3 % Tris, 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,1% Tween). Tämän jälkeen membraania inkuboitiin tunnin ajan p-glykoproteiinispesifisen hiiressä tuotetun primäärivasta-aineen kanssa (Sigma P7965, 1:2000, 5% maitoliuoksessa), minkä jälkeen primäärivasta-aine pestiin pois 3x10 minuutin inkuboinneilla TBST-puskurissa. Hiiren proteiineihin sitoutuvan, vuohessa tuotetun piparjuuriperoksidaasikonjugoidun sekundäärivasta-aineen (1:2000 2,5 % maitoliuoksessa, Millipore, Temecula, CA, USA) annettiin vaikuttaa tunnin ajan, minkä jälkeen vasta-aineliuos pestiin pois 6x5 minuutin pesuilla TBST-puskurissa. Membraaniin sitoutunut vasta-aine detektoitiin hyödyntämällä sekundäärivasta-aineen piparjuuriperoksidaasin aiheuttamaa kemiluminesenssireaktiota sen reagoidessa ECL-detektioagenssin (Amersham ECL Prime Western Blotting, GE Healthcare) kanssa, ja kuvantamalla kemiluminesenssisignaali Bio-Rad Chemidoc -kuvantamislaitteella. Proteiinistandardit kuvattiin kolorimetrisesti samalla laitteella. Juovien signaalivoimakkuudet määritettiin ImageJ-ohjelmiston avulla, ja muiden juovien voimakkuudet suhteutettiin villityyppi CGC:n signaalivoimakkuuteen.

6.7 P-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuden tutkiminen kalseiininkertymiskokeella

Kalseiininkertymiskokeella HEK293-soluissa tutkittiin transduktio-olosuhteiden vaikutusta p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuteen, sekä verrattiin p-glykoproteiinivarianttien kuljetusaktiivisuutta villityypin p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuteen. Kokeessa substraattina käytettävä fluoresoimaton yhdiste kalseiini-AM (kalseiinin asetoksimetyyliesteri) pääsee lipofiilisyytensä ansiosta passiivisesti diffundoitumaan solukalvon läpi (Pasquier ym. 2013). Soluun siirryttyään solun sisäiset esteraasit pilkkovat sen nopeasti fluoresoivaksi kalseiiniksi. Entsymaattisen pilkkoutumisen jälkeen vapautuva kalseiinimolekyyli on polaarisempi kuin kalseiini-AM, eikä siten enää pääse passiivisesti ulos solusta. Toisin sanoen kalseiini kertyy solun sisälle, mikä voidaan detektoida mittaamalla fluoresenssia. Mitä enemmän p-glykoproteiinia ilmentyy, tai mitä aktiivisemmin se toimii, sitä tehokkaammin kalseiini-AM pumpataan solusta ulos, eli kokeessa havaittava fluoresenssisignaali on kääntäen verrannollinen p-glykoproteiinin määrään tai aktiivisuuteen solukalvolla.

HEK293-solut (10 000 solua/kuoppa eli 34500 solua/cm²) kasvatettiin poly-D-lyysiini-päällystetyissä 96-kuoppalevyissä. Tavoitteena oli saada koeasetelma toimimaan 96-kuoppalevyissä, sillä näin voitaisiin saavuttaa hyvä aika- ja kustannustehokkuus, kun rinnakkain voitaisiin testata useanlaisia olosuhteita. Soluja kasvatettiin istuttamisen jälkeen 24 tuntia, minkä jälkeen solut transdukoitiin halutulla P3-viruksella. Viruksen määrä varianttikokeiden transduktiossa oli 20 µl/cm² ja butyraatin pitoisuus 10 mM. Negatiivisena kontrollina käytettiin transduktioseosta pelkällä butyraatilla ilman virusta, sillä EYFP-virusta ei voinut tässä koeasetelmassa käyttää EYFP-proteiinin aiheuttaman fluoresenssin vuoksi. Soluja inkuboitiin viruksen kanssa 48 h, minkä jälkeen suoritettiin varsinainen koe kalseiini-AM-substraatilla. Kokeessa käytettiin verapamiilia p-glykoproteiini-inhibiittorina, jotta pystyttiin vertaamaan, mikä osuus havaitusta vaikutuksesta johtui p-glykoproteiinivälitteisestä kuljetuksesta. Koe suoritettiin 37 °C:ssa ja kaikki liuokset esilämmitettiin tähän lämpötilaan. Ennen varsinaista koetta kuoppien solut pestiin hellästi 200 µl:lla lämmintä TP-puskuria (10 % Gibco 10xHBSS, 0,6% HEPES, 0,035 % NaHCO₃, pH 7,4). Inhibiittorin kanssa (verapamiili TP-puskurissa,

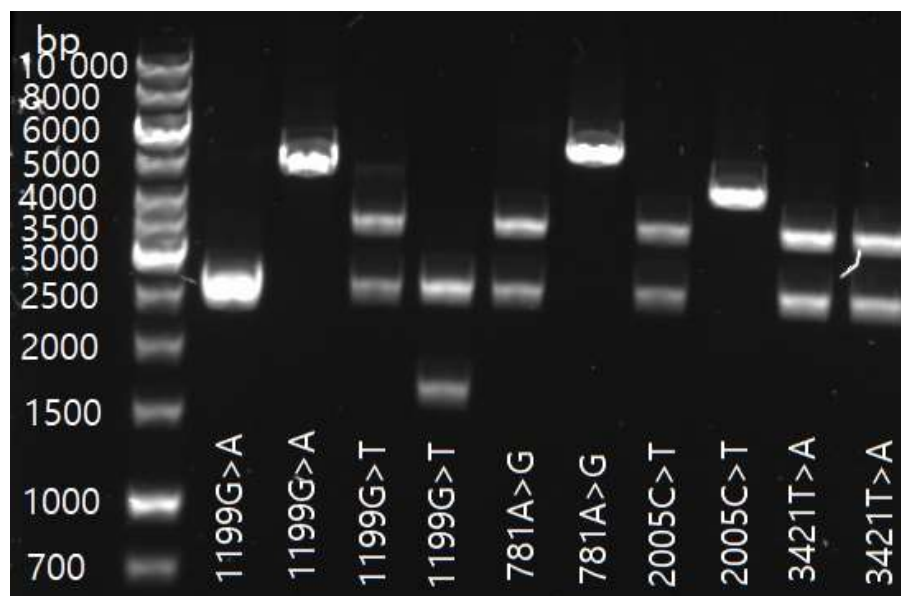
lopullinen pitoisuus 50 μM) soluja preinkuboitiin ennen koetta 15 minuutin ajan, ja ilman inhibiittoria olevat kuopat käsiteltiin vastaavasti kontrollipreinkubaatioliuoksella. Testiliuoksena käytettiin TP-puskuria, johon oli lisätty kalseiini-AM lopulliseen reaktiopitoisuuteen 1 μM , sekä osaan kuopista verapamiili. Koska substraattien ja inhibiittoreiden kantaliuokset olivat dimetyylisulfoksidipohjaisia (DMSO), mikä voi mahdollisesti vaikuttaa soluihin toksisesti, vakioitiin kussakin kokeen vaiheessa jokaisessa kuopassa oleva DMSO-pitoisuus samaksi: preinkubaation aikana DMSO-pitoisuus oli 0,5 %, ja varsinaisen testi-inkubaation aikana 0,7 %. Testiliuoksen kanssa soluja inkuboitiin 30 minuuttia, siten että fluoresenssi mitattiin Varioskan Lux -laitteella 5 minuutin välein 30 minuuttiin asti, pitäen laitteen lämpötila 37 °C:ssa. Eksitaatioaallonpituus oli 485 nm ja emissioaallonpituus 530 nm. Koska kokeen ja pesujen aikana mahdollisesti irtoavat solut voivat vaikuttaa tulokseen, tulokset suhteutettiin kuoppien kokonaisproteiinipitoisuuteen, joka määritettiin kokeen suorittamisen jälkeen. Kokonaisproteiinin määrittämisessä rinnakkaisten kuoppien näytteet yhdistettiin liuottamalla ne 0,1 M NaOH:iin ja määritettiin proteiinipitoisuus Bradfordin menetelmällä.

Varianttiproteiinien kuljetusaktiivisuutta mittaavassa kokeessa p-glykoproteiinivarianttien fluoresenssit suhteutettiin CGC-villityypin keskimääräiseen fluoresenssiin. Tulokset kahdesta eri kokeesta ($n=4$ ja $n=6$) yhdistettiin ja tilastollinen analyysi suoritettiin Graphpad Prism 9 -ohjelmiston avulla yksittäisten kuoppien lukuarvoilla, vertaamalla kaikkien muiden haplotyyppien ja varianttiproteiinien fluoresenssia (ilman verapamiilia) villityyppi CGC:n fluoresenssiin. Tilastolliseen analyysiin käytettiin nonparametrista yksisuuntaista ANOVAa ja Kruskal-Wallis testia.

7 TULOKSET

7.1 *ABCB1*-geenikonstruktit ja p-glykoproteiinin ilmentäminen bakulovirustransduktion avulla

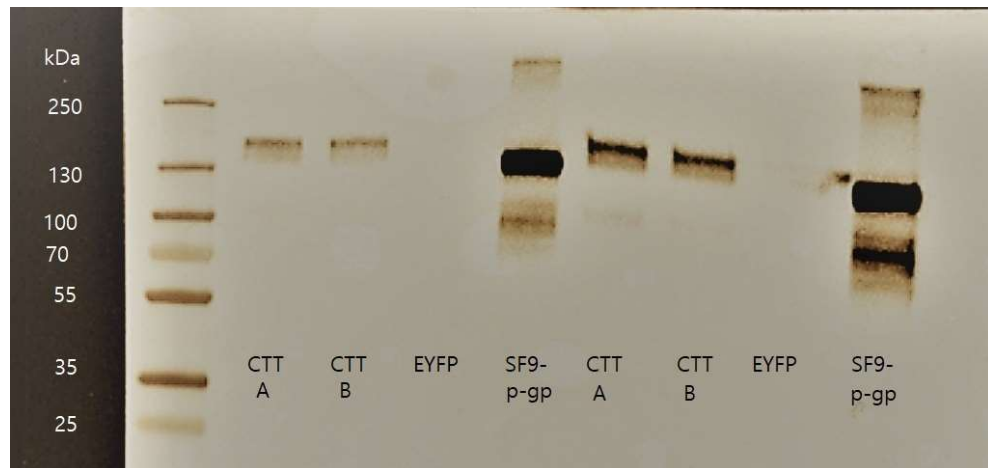
Tutkimuksen aikana saatiin valmistettua *ABCB1*-geenikonstruktit villityypin CGC, toisen yleisen haplotyyppin TTT, sekä neljän variantin (c.781A>G, c.1199G>T, c.2005C>T ja c.3421T>A) bakulovirusavusteiseen ilmentämiseen HEK293-soluissa. Variantin c.1199G>A mutatoiminen pENTR-vektoriin ei onnistunut, vaan restriktioanalyysi mutaation suorittamisen jälkeen paljasti toistuvasti vääränpituisia DNA-sekvenssejä plasmidissa (Kuva 5).



Kuva 5. Kohdennetulla mutageneesillä onnistuttiin valmistamaan polymorfismit c.781A>G, c.1199G>T, c.2005C>T ja c.3421T>A, mutta c.1199G>A-variantin valmistaminen ei onnistunut. *EcoRV*-entsyymi leikkaa pENTR-*ABCB1*-plasmidin kolmessa kohdassa, joista pitäisi tulla noin 3,7 kb ja 2,6 kb DNA-pätkät, sekä yksi 60 bp pätkä, joka on liian pieni näkymään geelillä. Täten c.1199G>T-, c.781A>G- ja c.2005C>T-varianteissa toinen kahdesta puhdistetusta plasmidista oli oikeanlainen, ja c.3421T>A-variantilla molemmat puhdistetut plasmidit. Sitä vastoin c.1199G>A-variantin kohdalla *EcoRV*-entsyymillä leikatut pätkät olivat väärän pituisia, eikä kyseisen mutaation suorittaminen onnistunut myöhemminkään.

P-glykoproteiinin ilmentämistä HEK293-soluissa kokeiltiin ensin alkuperäisestä CTT-haplotyyppistä valmistettujen bakulovirusten avulla. Western blot -kokeen avulla todettiin, että p-glykoproteiinin kokoon sopiva proteiini (n. 170 kDa, Morita ym. 2003) ilmentyi

transdusoiduissa soluissa, mutta sen määrä oli melko pieni verrattuna positiivisena kontrollina käytettyihin Sf9-p-glykoproteiinivesikkeleihin (Kuva 6). Lisäksi todettiin, että HEK293-soluissa näkyi vain hyvin vähäistä endogeenista p-glykoproteiinituotantoa sellaisissa HEK293-soluissa, joita ei ollut transdusoitu *ABCB1*-geenin sisältävällä bakuloviruksella, vaan EYFP-geenin sisältävällä bakuloviruksella (negatiivinen kontrolli).

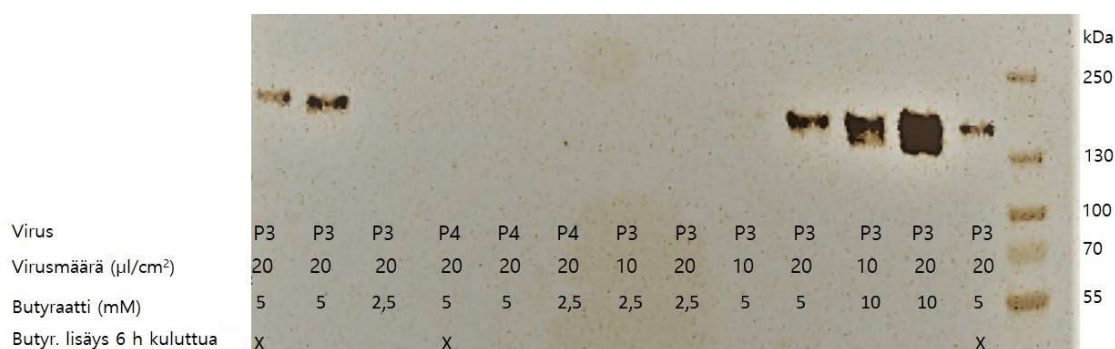


Kuva 6. Western blotin avulla varmistettiin, että p-glykoproteiini saatiin ilmentymään HEK293-soluissa bakulovirustransduktion avulla. Transduktio on tehty CTT-haplotyyppin bakuloviruksella 5 mM butyraattipitoisuudella, valmistaen kaksi rinnakkaista erää (A ja B) vesikkeleitä. Kaivoissa 2-5 vasemmalta oikealle vesikkelien proteiinimäärä on 10 µg ja kaivoissa 6-9 25 µg. EYFP-kontrollista havaitaan, että HEK293-soluissa ilmentyy vain hyvin vähän endogeenista p-glykoproteiinia. Positiivisena kontrollina käytettiin Sf9-p-glykoproteiinivesikkeleitä. Bakulovirustransduktion aiheuttama p-glykoproteiinin ilmentyminen CTT-vesikkeleissä A ja B jäi määrältään pienemmäksi verrattuna positiiviseen kontrolliin.

7.2 Virusmäärän ja transduktio-olosuhteiden vaikutus p-glykoproteiinin ilmentymiseen

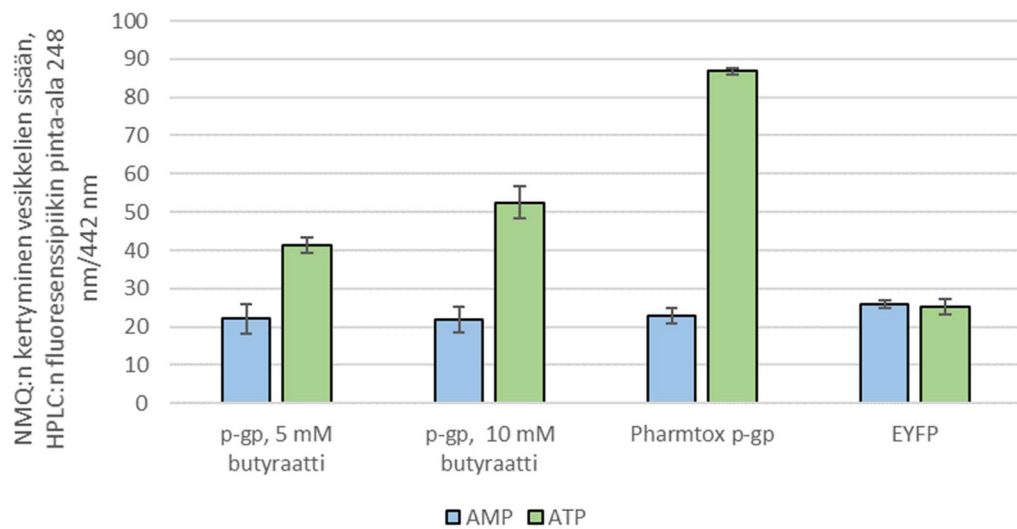
Transduktio-olosuhteita haluttiin optimoida, jotta transduktion tuloksena syntyvän p-glykoproteiinin määrä HEK293-soluissa saataisiin korkeammaksi. HEK293-solujen transduktio-olosuhteiden vaikutusta p-glykoproteiinin ilmentymiseen tutkittiin Western blot -kokeella CTT-haplotyyppin p-glykoproteiinibakuloviruksen avulla. P-glykoproteiinia ilmentyi selvästi enemmän käytettäessä transduktioseoksessa 10 mM butyraattipitoisuutta, kuin käytettäessä 5 mM butyraattipitoisuutta, ja 2,5 mM butyraattipitoisuudella ei saatu aikaan ollenkaan näkyvää proteiini-ilmentymistä (Kuva

7). Virusmäärällä 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ p-glykoproteiinia ilmentyi selvästi enemmän kuin 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ virusmäärällä. Lisäksi havaittiin, ettei butyraatin lisäämisestä vasta 6 tuntia viruksen lisäämisen jälkeen ollut hyötyä, vaan p-glykoproteiinia tuottui soluissa enemmän silloin, kun butyraatti lisättiin samaan aikaan viruksen kanssa. P4-viruksella ei saatu aikaan minkäänlaista näkyvää p-glykoproteiinin ilmentymistä soluissa. Täten seuraavat transduktiokokeet päätettiin suorittaa P3-viruksella 10 mM butyraattipitoisuudella ja 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ virusmäärällä.



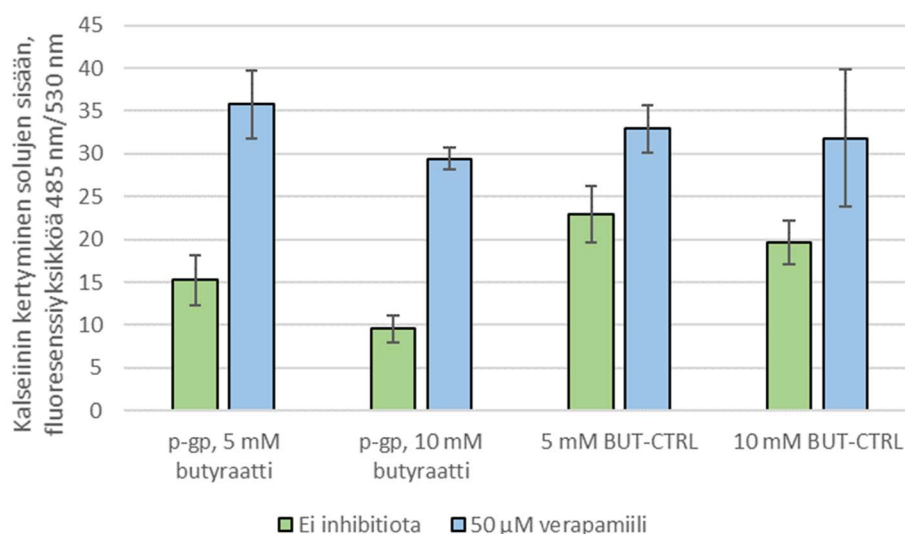
Kuva 7. Western blotin avulla tutkittiin virusmäärän (10 ja 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) ja butyraatin pitoisuuden (2,5 mM, 5 mM tai 10 mM) vaikutusta p-glykoproteiinin ilmentymiseen p-glykoproteiini-transdusoiduissa HEK293-soluissa. Lisäksi kokeiltiin butyraatin lisäämistä vasta 6 h viruksen lisäämisen jälkeen, sekä P4-viruksen tekemistä bakuloviruksista. Tehokkaimmin p-glykoproteiini saatiin ilmentymään, kun transduktioseoksessa käytettiin P3-virusta 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ja 10 mM butyraattipitoisuutta, joka lisättiin transduktioseokseen samaan aikaan viruksen kanssa.

Western blot -menetelmän lisäksi transduktio-olosuhteiden vaikutusta p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuteen tutkittiin vesikkelikuljetuskokeen avulla (Kuva 8). Koe vahvisti 10 mM butyraattipitoisuuden paremmaksi 5 mM butyraattipitoisuuteen nähden, eli p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuus oli korkeampi niissä vesikkeleissä, joiden virustransduktio oli tehty 10 mM butyraattipitoisuudella. Pariton parametrinen t-testi 1 %:n virheellisten löydösten osuudella antoi tulokseksi, että kaikissa vesikkeleissä lukuunottamatta negatiivista EYFP-kontrollia ATP-arvot erosivat merkitsevästi AMP-arvoista ($P < 0,05$).



Kuva 8. Transduktio-olosuhteiden vaikutus p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuteen mitattuna n-metyylikinidiin (NMQ) kertymisenä HEK293-vesikkeleihin. Vesikkeleitä inkuboitii 3 minuutin ajan 37 °C:ssa 2 μ M NMQ:n kanssa joko 4 mM ATP:n tai 4 mM AMP:n läsnäollessa. EYFP-vesikkeleissä (negatiivinen kontrolli) AMP- ja ATP-olosuhteissa ei ollut eroa, eli aktiivista kuljetusta ei havaittu. 10 mM butyraatti transduktioseoksessa johti suurempaan p-glykoproteiiniaktiivisuuteen kuin 5 mM butyraatti. Kuljetusaktiivisuus jäi kuitenkin pienemmäksi kuin positiivisessa kontrollissa (Pharmtox HEK293-p-glykoproteiinivesikkeli). Kuvaajassa on esitetty kolmen rinnakkaismittauksen keskiarvo ja keskihajonta.

P-glykoproteiinin korkeampi kuljetusaktiivisuus 10 mM butyraattipitoisuudella transdusoiduissa HEK293-soluissa verrattuna 5 mM butyraattipitoisuudella transdusoituihin soluihin nähtiin myös kalseiininkertymiskokeessa (Kuva 9). Kalseiinia kertyi selvästi vähemmän p-glykoproteiinitransdusoituihin soluihin kuin negatiivisiin butyraattikontrolleihin, ja 10 mM butyraattipitoisuus p-glykoproteiinin transduktioseoksessa johti vähäisempään kalseiinin kertymiseen kuin 5 mM butyraattipitoisuus. Verapamiilin (50 μ M) lisääminen nosti soluun kertyvän kalseiinin määrää, eli p-glykoproteiini vaikutti inhiboituvan. Kuitenkin myös negatiivisissa kontrolleissa, joiden transduktioseokseen oli käytetty pelkkää butyraattia eikä ollenkaan p-glykoproteiinibakulovirusta, nähtiin selvä signaalin nousu verapamiilin vaikutuksesta.



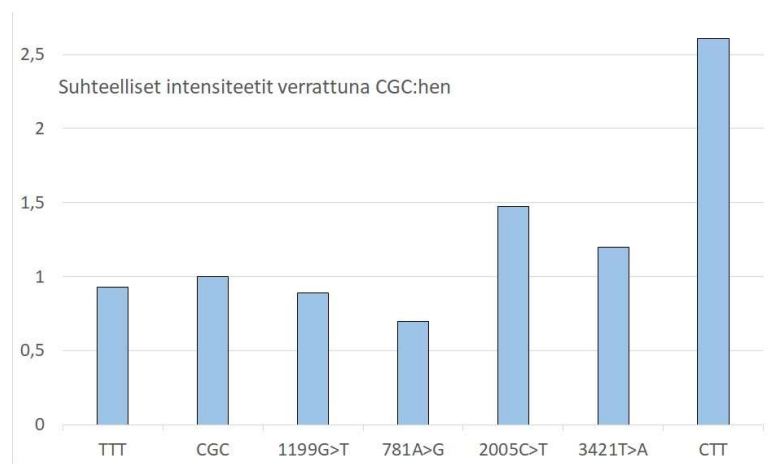
Kuva 9. Kalseiininkertymiskokeessa ($1 \mu\text{M}$ kalseiini-AM, 37°C) p-glykoproteiinin (CTT-haplotyyppi) effluksiaktiivisuus oli selvästi korkeampi, kun HEK293-solujen transduktioon käytettiin 10 mM butyraattia, kuin käytettäessä 5 mM butyraattia. Verapamiilin ($50 \mu\text{M}$) lisäys aiheutti signaalin nousua myös ilman bakulovirusta tehdyissä kontrolleissa (negatiivinen kontrolli, BUT-CTRL). Kuvaajassa on esitetty kuuden rinnakkaismittauksen keskiarvo ja keskihajonta 25 minuutin aikapisteessä.

7.3 Varianttien ilmentyminen ja aktiivisuus verrattuna villityyppeihin

P-glykoproteiinivarianttien proteiinitason ilmentymistä verrattiin villityyppeihin Western blot -kokeen avulla (Kuvat 10A ja 10B). P-glykoproteiinin ilmentäminen virustransduktion avulla onnistui niin CGC-villityypissä, CTT- ja TTT-haplotyypeissä, kuin kaikissa varianteissakin. Kuitenkin ilmentyminen oli huomattavasti vähäisempää, kuin positiivisena kontrollina käytetyissä kaupallisissa vesikkeleissä. Koe vahvisti aiemman Western blot -kokeen tuloksen, jonka mukaan endogeeninen p-glykoproteiinituotanto HEK293-soluissa oli vähäistä, sillä EYFP-bakuloviruksella tai pelkällä butyraattiliuoksella transdusoiduissa negatiivisissa kontrolleissa ei nytkään ollut havaittavissa selkeää signaalia.

Koska *ABCB1*-varianttigenit oli mutatoitu CGC-villityyppiin, varianttien p-glykoproteiinimäärää tarkasteltaessa vertailukohtana käytettiin CGC-villityyppiä. Western blot -kuvan juovien määritettyjen intensiteettien perusteella näyttää siltä, että c.781A>G-variantin tuottaman proteiinin määrä on hieman pienempi kuin villityyppi CGC:n, ja c.2005C>T- sekä c.3421T>A-varianttien tuottamien proteiinien määrä

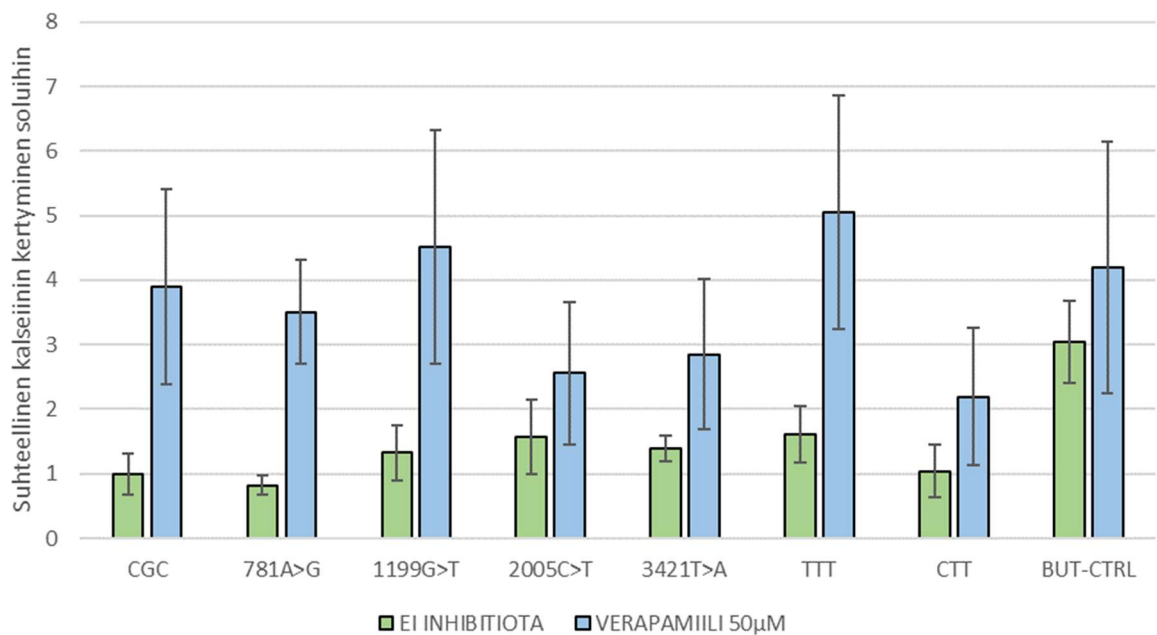
puolestaan hieman suurempi kuin villityypin. Variantin c.1199G>T ja TTT-haplotyyppin kohdalla tuottunut proteiinimäärä ei merkittävästi eroa CGC-villityypistä.



B

Kuva 10A. P-glykoproteiinivarianttien proteiinitason ilmentyminen HEK293-soluissa määritettynä Western blot -kokeen avulla. Kokonaisproteiinimäärä kussakin kuopassa oli 20 µg. Positiivisena kontrollina käytettiin Sf9- ja HEK293-soluissa tuotettuja p-glykoproteiinivesikkeleitä ja negatiivisena kontrollina vesikkeleitä, joiden transduktioseokseen oli lisätty EYFP-bakulovirusta tai pelkkää butyraattia. 781>G-variantti tuotti hieman vähemmän p-glykoproteiinia kuin villityyppi CGC, kun taas 2005C>T- ja 3421T>A-varianteissa ilmentyneen p-glykoproteiinin määrä oli hieman suurempi suhteessa CGC-villityyppiin. Kuva 10B. Western blot -juovien intensiteetit suhteutettuna villityyppi CGC:n intensiteettiin. Intensiteetit on arvioitu ImageJ-ohjelmiston avulla.

Western blot -kokeen lisäksi variantteja verrattiin villityyppeihin tutkimalla niiden kuljetusaktiivisuutta kalseiininkertymiskokeen avulla *ABCB1*-transdusoiduissa HEK293-soluissa (Kuva 11). Kun fluoresenssiarvot suhteutettiin villityypin CGC-fluoresenssiin (ilman inhibitiota), havaittiin, että varianttien kuljetusaktiivisuuden erot verrattuna villityyppiin CGC olivat melko pieniä. Tilastollisen analyysin mukaan negatiivisen butyraattikontrollin lisäksi vain TTT-haplotyyppin kuljetusaktiivisuus erosi merkitsevästi CGC-villityypin kuljetusaktiivisuudesta ($p < 0,05$). Kalseiinia kertyi soluihin TTT-haplotyyppillä 1,6-kertaisesti verrattuna CGC-villityyppiin, eli TTT-haplotyyppin p-glykoproteiini toimi tulosten mukaan heikommin kuin villityyppi. Herkkyys verapamiili-inhibitiolle näyttäisi olevan jonkin verran heikentynyt c.2005C>T- ja c.3421T>A-varianteissa sekä CTT-haplotyyppissä, sillä näissä varianteissa inhibiittorin lisääminen ei aiheuttanut yhtä suurta nousua kalseiinin kertymisessä kuin CGC-villityypissä.



Kuva 11. P-glykoproteiinipolymorfismien vaikutus kalseiinin kertymiseen HEK293-soluissa. Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa 1 µM kalseiini-AM:n kanssa joko ilman verapamiilia tai 50 µM verapamiilin kanssa. Kalseiinia kertyi soluihin sitä enemmän, mitä vähäisempää p-glykoproteiiniaktiivisuus on. Kuvassa on esitetty keskiarvot ja keskihajonnat kahdesta kokeesta yhdistetyistä tuloksista (n=4 ja n=6). Fluoresenssiarvot 25 min aikapisteessä on suhteutettu kuoppien proteiinimäärään ja villityypin CGC fluoresenssiin. Tilastollisen analyysin mukaan vain TTT-haplotyyppin kuljetusaktiivisuus poikkesi merkittävästi ($p < 0,05$) CGC-villityypistä (negatiivisen kontrollin BUT-CTRL lisäksi).

8 POHDINTA

Tutkimuksen aikana saatiin valmistettua neljä p-glykoproteiinivarianttia viidestä aiotusta, sekä ilmennettyä niitä HEK293-soluissa. Variantin c.1199G>A mutatoiminen pENTR-vektoriin epäonnistui: tähän voisi olla syynä esimerkiksi mutageneesialukkeen epäspesifinen sitoutuminen, eli sitoutuminen väärään kohtaan templaattisekvenssissä. Kyseisen variantin puuttuminen oli harmillista, sillä siitä oli tehty eniten aiempia tutkimuksia, ja siten c.1199G>A-varianttia olisi voitu käyttää eräänlaisena sisäisenä kontrollina tutkimusmenetelmien toimivuudesta/luotettavuudesta. Tämä variantti kannattaisikin valmistaa myöhemmin suunnittelemalla alukkeet uudelleen.

Tutkittaessa p-glykoproteiinin polymorfismeja tulee ottaa huomioon, että kolmessa kohdassa *ABCB1*-geenin sekvenssissä polymorfismit ovat erittäin yleisiä, ja osassa etnisistä ryhmistä varianttialleeli tai varianttihaplotyyppi on jopa yleisempi kuin ns. villityyppi. Täten kannattaa suunnitella, missä ympäristössä näiden yleisimpien varianttien suhteen tutkittavia variantteja ilmennetään, jotta tulokset olisivat mahdollisimman relevantteja sen suhteen, minkälaisessa alleeliympäristössä ne populaatioissa todellisuudessa esiintyvät. Villityyppi CGC:n lisäksi saatiin valmistettua toinen yleinen haplotyyppi TTT, joka esiintyy erityisesti aasialaista alkuperää olevissa populaatioissa. Tätä haplotyyppiä voidaan mahdollisesti hyödyntää myöhemmin, mikäli halutaan esimerkiksi tutkia toisia polymorfismeja, jotka esiintyvät pääasiassa aasialaista alkuperää olevissa populaatioissa. Itsessään CGC- ja TTT-haplotyypejä on tutkittu jo todella paljon, mutta toisaalta molempien haplotyyppien mukanaolo toimii myös eräänlaisena kontrollina, kun tutkimustuloksia näistä haplotyypeistä voidaan verrata kirjallisuuteen.

Tutkittaessa varianttiproteiinien toimintaa on tärkeää varmentaa, että tutkittavaa proteiinia on transduktion seurauksena saatu ilmentymään riittävä määrä (Zubiaur ym. 2018). Useimmissa solulinjoissa on jonkinasteinen endogeeninen p-glykoproteiinituotanto, mikä täytyy huomioida riittävien kontrollien valinnassa (Brouwer ym. 2013). Varianttiproteiinin ilmentyminen tulee siis olla huomattavasti suurempaa kuin endogeenisen proteiinituotannon, jotta voidaan sanoa nähtävien vaikutusten johtuvan varianttiproteiinista. Bakulovirustransduktion avulla variantteja saatiin ilmennettyä

HEK293-soluissa, ja niiden ilmentymistasoja saatiin myös optimoitua butyraattipitoisuuden ja virusmäärän suhteen, ilmentymisen ollessa suurin, kun transduktiossa käytettiin 10 mM butyraattipitoisuutta ja 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ virusmäärää. Lisäksi vastaava riippuvuus havaittiin kuljetusaktiivisuutta tutkivissa kokeissa membraanivesikkeleissä ja kalseiininkertymiskokeissa, kuljetusaktiivisuuden ollessa suurempi transduktiobutyraattipitoisuuden ollessa 10 mM. Todennäköisesti näissä kokeissa kuljetusaktiivisuuden muutos johtui siis proteiinin ilmentymisen lisääntymisestä. Bakulovirusprotokollan mukaan maksimaalinen ilmentyminen saavutetaan 24–48 tunnin kuluttua transduktiosta, joten ilmentymistä voisi edelleen yrittää optimoida esimerkiksi tutkimalla ilmentymistasoa Western blot -kokeen avulla eri aikapisteissä. Mahdollisia varianttien välisiä eroja saatettaisiin saada paremmin esiin, jos ilmentyvän p-glykoproteiinin määrää saataisiin nostettua. Toisaalta kalvoproteiinin ilmentymistaso kannattaa olla lähellä fysiologista tasoa, eikä varianttiproteiinin osuus koko solukalvon proteiineista siten myöskään kannata olla liian suuri. Liian voimakas ilmentyminen voisi aiheuttaa muutoksia solukalvon liikkuvuudessa ja nestemäisyydessä, ja sitä kautta kalvoproteiinin toiminnassa (Sharom 2014).

Vesikkelikuljetuskoe saatiin alustavissa kokeissa toimimaan melko hyvin, ja hajonta oli tässä koemenetelmässä melko pientä. Tilastollisen analyysin perusteella aktiivinen kuljetus saatiin hyvin erottumaan taustasta, vaikkakin toistojen määrä kokeessa oli liian pieni luotettavaan tilastolliseen analyysiin. Vesikkelien valmistuksessa käytettiin transduktion jälkeen kolmen vuorokauden inkubointia, kun taas kalseiininkertymiskokeessa ja Western blot -kokeessa vastaava aika oli kaksi vuorokautta. Voisikin olla kannattavaa kokeilla ajan vaikutusta p-glykoproteiinin ilmentymiseen myös vesikkeleiden valmistuksessa esimerkiksi Western blot -kokeen avulla.

Kun varianttiproteiinien ilmentymistasoa verrattiin villityypin p-glykoproteiinin ilmentymistasoon Western blot -kokeen avulla, havaittiin että ilmentymistasossa oli vain pieniä eroja. Tämä tulos on yhtenevä näillä varianteilla tehtyjen aiempien tutkimusten kanssa, joissa on myöskin havaittu vain pieniä eroja ilmentymistasossa (Crouthamel ym. 2006, Jeong ym. 2007, Gow ym. 2008). On kuitenkin huomattava, että tässä tutkimuksessa käytettyä koeasetelmaa ei oltu optimoitu kvantitoinnin suhteen, joten tulokset ovat vain suuntaa antavia. Western blot -koe kannattaisikin toistaa ja optimoida

menetelmä kvantitoinnin suhteen. CTT-haplotyyppin ilmentyminen näytti Western blot -kokeen perusteella huomattavasti suuremmalta kuin muiden, mutta tämä viruserä oli valmistettu suuremmalla bakmidimäärällä kuin muut, joten tätä määrää ei kannata verrata muihin. Bakulovirukset eivät myöskään lisäänty nisäkässoluissa, vaan tuotetun proteiinin määrä riippuu suoraan siitä, mikä määrä virusgenomeja menee solun sisään (Graves ym. 2018). Tästä syystä bakuloviruserien infektiokerroin (multiplicity of infection) olisi hyvä määrittää, jotta voitaisiin sanoa olosuhteiden olevan jokaisessa transduktiossa toisiaan vastaavat.

Varianttiproteiinien kuljetusaktiivisuutta ehdittiin tämän tutkimuksen puitteissa tutkia vain kalseiininkertymiskokeen avulla HEK293-soluissa, ja lisäksi tämän tutkimuksen aikana kalseiininkertymiskoe ehdittiin toistaa vain kahdesti. Aiemmissä tutkimuksissa c.2005C>T-variantin on todettu kuljettavan villityyppiä tehokkaammin daunorubisiinia ja doksirubisiinia (Jeong. ym. 2007), mutta paklitakselin ja etoposidin kuljetuksen taas on todettu heikentyneen villityyppiin verrattuna (Liu ym. 2010). Resistenssin doksirubisiinia kohtaan on todettu kasvaneen myös c.3421T>A-polymorfismin vaikutuksesta, mutta daunorubisiinia kohtaan sitä vastoin ei (Jeong ym. 2007). Polymorfismi c.1199G>T: puolestaan on todettu aiheuttaneen vähentyneen resistenssin sytotoksisille lääkeaineille, mistä p-glykoproteiinin kuljetusaktiivisuuden kyseisten aineiden suhteen pääteltiin heikentyneen (Crouthamel ym. 2006). Näissä aiemmissä tutkimuksissa vaikutukset ovat kuitenkin pääsääntöisesti olleet melko pieniä tilastollisesta merkitsevyydestä huolimatta. Tässä tutkimuksessa tilastollisesti merkittävä ero villityyppiin CGC verrattuna havaittiin ainoastaan TTT-haplotyyppin kohdalla, vaikka silmämääräisesti useammassa variantissa oli pieniä eroja villityyppiin verrattuna. TTT-varianttihaplotyyppi kuljetti tämän tutkimuksen mukaan kalseiini-AM:ää tehottomammin kuin CGC-villityyppi, mikä on linjassa useiden aiempien tutkimusten kanssa (Keskitalo ym. 2008, Vivona ym. 2014, Dessilly ym. 2016a), vaikkakin aiemmat tutkimukset aiheesta ovat sisältäneet myös ristiriitaisia tuloksia. Aiemmissä tutkimuksissa on lisäksi havaittu polymorfismien vaikuttavan joissain tapauksissa inhibioherkkyyteen. Tässä tutkimuksessa vaikutti siltä, että herkkyys verapamiili-inhibitiolle saattoi olla heikentynyt c.2005C>T- ja c.3421T>A-varianteissa, mutta toisaalta on huomioitava, että hajonta oli erityisen suurta verapamiililla inhiboiduissa kuopissa, mikä heikentää inhibioherkkyydestä tehtävien päätelmien luotettavuutta.

Kalseiininkertymiskokeessa ongelmaksi muodostuivat suuri hajonta sekä solujen irtoaminen kokeen aikana todennäköisesti pesujen vaikutuksesta. Hajontaa yritettiin hallita siten, että fluoresenssisignaalin suuruus suhteutettiin kuoppien kokonaisproteiinimäärään. Koska kokonaisproteiinimäärä kuitenkin määritettiin 3–4 rinnakkaisesta kuopasta yhdistettynä eikä jokaisesta kuopasta erikseen, ei voida sanoa varmasti, johtuiko hajonnan suuruus solujen irtoamisesta. Kalseiininkertymiskokeen tulokset varianttien kuljetusaktiivisuudesta olivat kuitenkin samansuuntaisia kahdella erimittauskerralla suoritetuissa kokeissa (n=4 ja n=6). Toisaalta mikäli varianttiproteiini ilmentyisi voimakkaasti soluissa, ja varianttiproteiinien ilmentymismäärässä olisi suuria eroja, ei signaalin suhteuttaminen kuoppien kokonaisproteiinimäärään välttämättä olisikaan järkevin vaihtoehto, sillä kokonaisproteiinimäärä saattaisi olla muuttunut eri varianteissa transduktion vaikutuksesta. Proteiinimäärän sijasta signaali voitaisiin suhteuttaa elossa olevien solujen määrää kussakin kuopassa määrittämällä solujen elinkyky. Lisäksi kalseiininkertymiskokeessa olisi mahdollista käyttää suspensiossa olevia soluja ja mitata fluoresenssi virtaussytometrialla, jolloin solujen irtoaminen ei olisi ongelma.

Kalseiininkertymiskokeessa käytettiin p-glykoproteiinin inhibiittorina 50 μM verapamiilia, jonka pitäisi inhiboida p-glykoproteiinin toiminta kokonaan (Jouan ym. 2016). Kokeissa kuitenkin havaittiin, että myös negatiivisessa butyraattikontrollissa, johon ei transduoitu mitään bakulovirusta, havaittiin merkittävää signaalinnousua verapamiilin vaikutuksesta. Tämä voi johtua mahdollisesti endogeenisestä p-glykoproteiinin ilmentymisestä, tai jonkun toisen kuljetinproteiinin toiminnasta. HEK293-soluissa ilmentyy kirjallisuuden mukaan endogeenisesti jonkun verran sekä p-glykoproteiinia että MRP1-kuljetinproteiinia (Ahlin ym. 2009), mutta Western blot -kokeiden perusteella endogeenisen p-glykoproteiinin ilmentyminen soluissa oli vähäistä. Lisäksi koska kalseiininkertymiskokeessa näkyi signaalin nousu inhibiittorin vaikutuksesta negatiivisessa kontrollissa, mutta vesikkelikokeessa EYFP-kontrollissa ATP:n ja AMP:n välillä ei havaittu eroa, mahdollisesti ilmiön saattaa aiheuttaa jokin toinen kuljetinproteiini. Kalseiini-AM on myös MRP1:n substraatti (Dogan ym. 2004), ja (R)-verapamiili on myös sen inhibiittori (Perrotton ym. 2007), joten tämä voisi olla mahdollinen syy signaalin nousuun myös negatiivisissa kontrolleissa verapamiilin

vaikutuksesta. Näin voidaan ajatella, että vesikkelikuljetuskoe saattaisi olla luotettavampi koeasetelma p-glykoproteiiniaktiivisuuden tutkimiseen.

Aiemmin on todettu, että p-glykoproteiinipolymorfismien vaikutukset ovat usein substraalista riippuvaisia (Woodahl ym. 2004, Jeong ym. 2007, Dessilly ym. 2014). Kumpikin tutkimuksessa p-glykoproteiiniaktiivisuuden määrittämiseen käytetty tutkimusmenetelmä on kuitenkin varsin riippuvainen juuri kyseisestä substraalista, joten näissä koeasetelmissa ei sellaisenaan ole mahdollista vaihtaa substraattia. Tämän tutkimuksen aikana saatiin kuitenkin optimoitua kahdenlaista tutkimusmenetelmää kahdella eri substraattilla. Varsinaisia p-glykoproteiinivariantteja ei vielä tämän tutkimuksen aikana ehditty tutkia vesikkelikuljetuskokeella, joten tutkimusta kannattaisi jatkaa siihen suuntaan. Tällöin voitaisiin verrata, ovatko tulokset samansuuntaisia eri menetelmillä ja eri substraateilla. Jos substraattivalikoimaa halutaan laajentaa, olisi mahdollista tutkia variantteja erilaisilla sytotoksisuuskokeilla. Niissä substraatteina käytetään soluille myrkyllisiä lääkeaineita, jotka aiheuttavat solukuoleman sitä tehokkaammin, mitä vähäisempi p-glykoproteiiniaktiivisuus soluissa on.

Kumpikaan tutkimuksessa käytetyistä substraateista (NMQ tai kalseiini-AM) ei ole kliinisesti käytetty lääkeaine, joten vaikka eroja eri varianttien välillä löytyisikin, tämä ei suoraan kertoisi näiden polymorfismien merkitystä lääkehoidoissa. Polymorfismivaikutusten substraattiriippuvaisen luonteen vuoksi vaikutus kuhunkin lääkeaineeseen tulisi selvittää erikseen. Lisäksi p-glykoproteiinin määrä eri kudoksissa vaihtelee, joten polymorfismin vaikutus tietyn lääkeaineen suhteen riippuu kyseisen lääkeaineen farmakokinetiikasta ja farmakodynamiikasta. Tämän tutkimuksen tulokset eivät myöskään kerro, aiheuttavatko polymorfismit muutoksia proteiinin lokalisaatiossa solukalvolla, eikä sitä, millä mekanismilla mahdolliset muutokset aiheutuvat (esim. ATPaasi-aktiivisuuden muutos tai substraatin sitoutumisen muutos). Lisäksi on huomioitava, että todellisuudessa p-glykoproteiinin ilmentymisen ja aktiivisuuden säätely kudoksissa on monimutkainen prosessi, johon vaikuttaa monia muitakin tekijöitä kuin polymorfismi.

Kuten kirjallisuuskatsauksessa todettiin, yleisesti ottaen p-glykoproteiinin polymorfismien aiheuttamat vaikutukset lääkeaineiden farmakokinetiikkaan sekä p-glykoproteiinin ilmentymistasoon ovat kirjallisuudenkin perusteella olleet melko pieniä,

ja tämän tutkimuksen tulokset ovat linjassa näiden havaintojen kanssa. Tämän voidaan ajatella kertovan tämän kuljetinproteiinin olennaisesta roolista ihmiselimistössä. Sellaiset mutaatiot, jotka aiheuttaisivat suuria eroja proteiinin ilmentymisessä tai kuljetusaktiivisuudessa, eivät mahdollisesti ole päässeet yleistymään populaatioissa evoluution aikana.

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Solukalvon kuljetinproteiinit vaikuttavat merkittävästi lääkeaineiden farmakokinetiikkaan, joten kuljetinproteiinien geneeissä esiintyvä perinnöllinen muuntelu saattaa aiheuttaa yksilöiden välisiä eroja lääkevasteessa. Kuljetinproteiinien polymorfismeja tutkittaessa *in vitro* -tutkimuksilla on tärkeä rooli, sillä kliinisissä assosiaatiotutkimuksissa on vaikeaa sulkea pois muita lääkeaineiden farmakokinetiikkaan vaikuttavia asioita. Polymorfismeja voidaan tutkia *in vitro* aiheuttamalla haluttu mutaatio keinotekoisesti geeniin. Kuitenkin myös *in vitro* -tutkimukset ovat haastavia, sillä usein kuljetinproteiinien substraatteja kuljettavat tutkittavan proteiinin lisäksi myös muut kuljetinproteiinit, kuten on p-glykoproteiininkin kohdalla. Tutkimuksiin olisikin hyvä löytää mahdollisimman spesifinen substraatti ja spesifisiä inhibiittoreita. Lisäksi on tärkeää kontrolloida endogeenisen proteiini-ilmentymisen tasoa tutkimuksissa.

P-glykoproteiinin polymorfismeja tutkittaessa on tärkeää ottaa huomioon myös se, että p-glykoproteiinin geenissä esiintyy kolme erittäin yleistä polymorfismia, jotka ovat keskenään kytkentäepätasapainossa, ja joiden haplotyypeissä esiintyy etnistä vaihtelua. Täten tutkittaessa polymorfismeja *in vitro* voidaan pyrkiä tutkimaan polymorfismeja yhdistettynä siihen haplotyyppiin, jossa niiden on todettu yleisimmin esiintyvän.

Tämän tutkimuksen perusteella tutkimuksen kohteena olleilla p-glykoproteiinivarianteilla (c.781A>G, c.1199G>T, c.2005C>T ja c.3421T>A) ei havaittu kalseiininkertymiskokeessa tilastollisesti merkitsevää eroa kuljetusaktiivisuudessa verrattuna villityyppiin CGC. Toisaalta koeasetelmaa ei saatu toimimaan kovin

luotettavasti, vaan hajonta oli suurta, joten koeasetelmaa olisi hyvä optimoida edelleen ja toistaa koe. Tutkimuksen aikana ei ehditty tutkia p-glykoproteiinivariantteja vesikkelikuljetuskokeella, joka vaikutti alustavissa tutkimuksissa toimivan hyvin, joten tutkimusta kannattaisi jatkaa siihen suuntaan. Aiempien tutkimusten perusteella p-glykoproteiinipolymorfismien vaikutusten tiedetään usein olevan substraatista riippuvaisia, joten tämänkin takia olisi hyvä tutkia variantteja vähintään yhdellä toisellakin substraatilla. P-glykoproteiinin ilmentymistasossa ei myöskään havaittu varianttien välillä kovin suuria eroja, mutta tämäkin koe ehdittiin tutkimuksen puitteissa suorittaa vain kerran, ja koe kannattaisi sen vuoksi toistaa. Tutkimusmenetelmien optimoimista ja tutkimuksessa valmistettujen p-glykoproteiinivarianttien tutkimista kannattaakin siis jatkaa edelleen.

LÄHDELUETTELO

- Ahlin G, Hilgendorf C, Karlsson J, Szigartyo CA, Uhlén M, Artursson P. "Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs." *Drug Metab Dispos* 37(12):2275-83, 2009
- Ahmed S, Akram Husain RS, Kumar S ja Ramakrishnan V. "Association Between MDR1 Gene Polymorphisms and Parkinson's Disease in Asian and Caucasian Populations: a Meta-Analysis." *J Neurol Sci* 368 (2016): 255–262.
- Aird RE, Thomson M, Macpherson JS, Thurston DE, Jodrell DI, ja Guichard SM. "ABCB1 Genetic Polymorphism Influences the Pharmacology of the New Pyrrolobenzodiazepine Derivative SJG-136." *Pharmacogenomics J* 8, no. 4 (2007): 289.
- Allabi C, Gala C, ja Horsmans C. "CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) Genetic Polymorphisms and Phenytoin Metabolism in a Black Beninese Population." *Pharmacogenet Genomics* 15, no. 11 (2005): 779-786.
- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding." *Science* 2009 Mar 27;323(5922):1718-22.
- Ambudkar, Suresh. "Purification and Reconstitution of Functional Human P-glycoprotein." *J Bioenerg Biomembr* 27, no. 1 (1995): 23-29.
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, ja Gottesman MM. "P-glycoprotein: From Genomics to Mechanism." *Oncogene* 22, no. 47 (2003): 7468.
- Andersen V, Ostergaard M, Christensen J, Overvad K, Tjønneland A, Vogel U. "Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study." *BMC Cancer* 2009 Nov 21;9:407.
- Andersen V, Svenningsen K, Knudsen LA, Hansen AK, Holmskov U, Stensballe A, ja Vogel U. "Novel Understanding of ABC Transporters ABCB1/MDR/P-Glycoprotein, ABCC2/MRP2, and ABCG2/BCRP in Colorectal Pathophysiology." *World J Gastroenterol* 21.41 (2015): 11862–11876.
- Ankathil R. "ABCB1 genetic variants in leukemias: current insights into treatment outcomes." *Pharmgenomics Pers Med* 2017;10:169-181.
- Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. "Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis." *World J Gastroenterol* 2006;12(23):3636-3644.
- Anwar AM ja Ayman EK. "P-glycoprotein effects on drugs pharmacokinetics and drug drug-interactions and their clinical implications." *Libyan J Pharm & Clin Pharm* 2012, 1: 48154-

Baudou E, Lespine A, Durrieu G, André F, Gandia P, Durand C, Cunat S. "Serious Ivermectin Toxicity and Human *ABCB1* Nonsense Mutations." *N Engl J Med* 2020 Aug 20;383(8):787-789.

Binkhathlan Z, Lavasanifar A." P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives." *Curr Cancer Drug Targets* 2013 Mar;13(3):326-46.

Brouwer KLR, Keppler D, Hoffmaster KA, Bow DAJ, Cheng Y, Lai Y, Palm JE, Stieger B, ja Evers R. "In Vitro Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development." *Clin Pharmacol Ther* 94, no. 1 (2013): 95.

Campa D, Sainz J, Pardini B, Vodickova L, Naccarati A, Rudolph A, Novotny J, Försti A, Buch S, von Schönfels W, Schafmayer C, Völzke H, Hoffmeister M, Frank B, Barale R, Hemminki K, Hampe J, Chang-Claude J, Brenner H, Vodicka P ja Canzian F. "A comprehensive investigation on common polymorphisms in the MDR1/ABCB1 transporter gene and susceptibility to colorectal cancer." *PLoS One*. 2012;7(3):e32784.

Chai AB, Leung GKF, Callaghan R, Gelissen IC. "P-glycoprotein: a role in the export of amyloid- β in Alzheimer's disease?" *FEBS J*. 2020 Feb;287(4):612-625.

Choi KH, Chen CJ, Kriegler M, Roninson IB. "An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene." *Cell* 1988 May 20;53(4):519-29.

Christians U, Schmitz V, Haschke M. "Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005 Dec;1(4):641-54.

Chufan EE, Sim HM, Ambudkar SV. "Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies." *Adv Cancer Res*. 2015;125:71-96.

Crouthamel MH., Wu D, Yang Z, ja Ho RJY. "A Novel MDR1 G1199T Variant Alters Drug Resistance and Efflux Transport Activity of P-glycoprotein in Recombinant Hek Cells." *J Pharm Sci* 95, no. 12 (2006): 2767-2777.

Dastvan R, Mishra S, Peskova YB, Nakamoto RK, Mchaourab HS. "Mechanism of allosteric modulation of P-glycoprotein by transport substrates and inhibitors." *Science* 2019 May 17;364(6441):689-692.

Dessilly G, Elens L, Panin N, Capron A, Decottignies A, Demoulin JB, ja Haufroid V. "ABCB1 1199G>A Genetic Polymorphism (Rs2229109) Influences the Intracellular Accumulation of Tacrolimus in HEK293 and K562 Recombinant Cell Lines." *PLoS ONE* 9, no. 3 (2014).

Dessilly G, Panin N, Elens L, Haufroid V, ja Demoulin JB. "Impact of ABCB1 1236C>T-2677G>T-3435C>T Polymorphisms On the Anti-proliferative Activity of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Ponatinib." *Scientific Reports* 6, no. 1 (2016a).

Dessilly G, Elens L, Panin N, Karmani L, Demoulin JB, ja Haufroid V. "ABCB1 1199G>A Polymorphism (rs2229109) Affects the Transport of Imatinib, Nilotinib and Dasatinib." *Pharmacogenomics* 17, no. 8 (2016b): 883.

- Di Pietro A, Dayan G, Conseil G, Steinfelds E, Krell T, Tromprier D, Baubichon-Cortay H, Jault J. "P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships." *Braz J Med Biol Res* 1999 Aug;32(8):925-39.
- Dogan AL, Legrand O, Faussat AM, Perrot JY, Marie JP. "Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines." *Leuk Res* 2004 Jun;28(6):619-22.
- El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, Elakraa G. "The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy." *Front Pharmacol* 2017 Jan 10;7:535.
- El-Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Krieger E, Russel FG, Koenderink JB. "Functional role of arginine 375 in transmembrane helix 6 of multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)." *Mol Pharmacol* 2008 Oct;74(4):964-71.
- EMA 2012: "Guideline on the investigation of drug interactions." European Medicines Agency, 2012. Saatavilla verkosta https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf
- FDA 2020: "Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions: Guidance for Industry." U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2020. Saatavilla verkosta <https://www.fda.gov/media/134582/download>
- Fehér Á, Juhász A, Pákási M, Kálmán J, Janka Z. "ABCB1 C3435T polymorphism influences the risk for Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* 2014 Dec;54(4):826-9.
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. "Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Jan;84(1):265-9.
- Fung KL ja Gottesman MM. "A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function." *Biochim Biophys Acta* 2009 May;1794(5):860-71.
- Fung KL, Pan J, Ohnuma S, Lund PE, Pixley JN, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. "MDR1 synonymous polymorphisms alter transporter specificity and protein stability in a stable epithelial monolayer." *Cancer Res* 2014 Jan 15;74(2):598-608.
- Gow JM, Hodges LM, Chinn LW, Kroetz DL. "Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms." *J Pharmacol Exp Ther* 2008 May;325(2):435-42.
- Gozalpour E, Wittgen HG, van den Heuvel JJ, Greupink R, Russel FG, Koenderink JB. "Interaction of digitalis-like compounds with p-glycoprotein." *Toxicol Sci* 2013 Feb;131(2):502-11.
- Grantham R. "Amino acid difference formula to help explain protein evolution." *Science* 1974 Sep 6;185(4154):862-4.

- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. "The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin." *J Clin Invest* 1999 Jul;104(2):147-53.
- Hemauer SJ, Nanovskaya TN, Abdel-Rahman SZ, Patrikeeva SL, Hankins GD, Ahmed MS. "Modulation of human placental P-glycoprotein expression and activity by MDR1 gene polymorphisms." *Biochem Pharmacol* 2010 Mar 15;79(6):921-5.
- Higgins CF ja Gottesman MM. "Is the multidrug transporter a flippase?" *Trends Biochem Sci* 1992 Jan;17(1):18-21.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Mar 28;97(7):3473-8.
- Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Kasuga M, Okumura K. "Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin." *Pharm Res* 2002 Oct;19(10):1581-5.
- Hu R, Barratt DT, Collier JK, Sallustio BC, Somogyi AA. "CYP3A5*3 and ABCB1 61A>G Significantly Influence Dose-adjusted Trough Blood Tacrolimus Concentrations in the First Three Months Post-Kidney Transplantation." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018 Sep;123(3):320-326.
- Jeong H, Herskowitz I, Kroetz DL, Rine J. "Function-altering SNPs in the human multidrug transporter gene ABCB1 identified using a *Saccharomyces*-based assay." *PLoS Genet* 2007 Mar 9;3(3):e39.
- Jiang B, Yan LJ, Wu Q. "ABCB1 (C1236T) Polymorphism Affects P-Glycoprotein-Mediated Transport of Methotrexate, Doxorubicin, Actinomycin D, and Etoposide." *DNA Cell Biol* 2019 May;38(5):485-490.
- Jouan E, Le Vée M, Mayati A, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O. "Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay." *Pharmaceutics* 8(2):12, 2016
- Juliano RL, ja Ling V. "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-162.
- Karlsson L, Green H, Zackrisson AL, Bengtsson F, Jakobsen Falk I, Carlsson B, Ahlner J, Kugelberg FC. "ABCB1 gene polymorphisms are associated with fatal intoxications involving venlafaxine but not citalopram." *Int J Legal Med* 2013 May;127(3):579-86.
- Keats BJB ja Sherman SL: "Population Genetics". Luku 13 kirjassa: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, kuudes painos. Toim. Rimoin D, Pyeritz R, Korf B. Elsevier Science, San Diego, 2013.
- Keskitalo JE, Kurkinen KJ, Neuvoneni PJ, Niemi M. "ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin." *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Oct;84(4):457-61.

- Keskitalo JE, Kurkinen KJ, Neuvonen M, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M. “No significant effect of ABCB1 haplotypes on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin, lovastatin, and rosuvastatin.” *Br J Clin Pharmacol* 2009 Aug;68(2):207-13.
- Kim Y ja Chen J. “Molecular Structure of Human P-Glycoprotein in the ATP-Bound, Outward-Facing Conformation.” *Science* 359.6378 (2018): 915–919.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Aug;70(2):189-99.
- Kimchi-Sarfaty C, Gripar JJ, Gottesman MM. “Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system.” *Mol Pharmacol.* 2002 Jul;62(1):1-6.
- Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, Kim IW, Jones A, Arora M, Gripar J, Gurwitz D, Gottesman MM. “Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene.” *Pharmacogenomics.* 2007a Jan;8(1):29-39
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. “A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity.” *Science* 2007b Jan 26;315(5811):525-8.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG; “Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene.” *Pharmacogenetics* 2003 Aug;13(8):481-94.
- Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y, Higuchi S, Otsubo K. “Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein.” *Clin Pharmacol Ther* 2002 Aug;72(2):209-19.
- Lai Y, Varma M, Feng B, Stephens JC, Kimoto E, El-Kattan A, Ichikawa K, Kikkawa H, Ono C, Suzuki A, Suzuki M, Yamamoto Y, Tremaine L. “Impact of drug transporter pharmacogenomics on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability - considerations for drug development.” *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012 Jun;8(6):723-43.
- Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. “Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice.” *Reprod Toxicol* 1998 Jul-Aug;12(4):457-63.
- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. “ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research.” *Pharmacogenomics J* 2007 Jun;7(3):154-79.

- Li XF, He HB, Zhu YS, He JK, Ye WW, Chen YX, Lou LQ. "Association between the c.3751G>a genetic variant of MDR1 and hepatocellular carcinoma risk in a Chinese Han population." *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(9):5361-5.
- Liu L, Fan L, Peng X, Hu D, Zhou H. "MDR1 C2005T polymorphism changes substrate specificity." *Cancer Chemother Pharmacol* 2010 Aug;66(3):617-23.
- Lutz JD, Kirby BJ, Wang L, Song Q, Ling J, Massetto B, Worth A, Kearney BP, Mathias A. "Cytochrome P450 3A Induction Predicts P-glycoprotein Induction; Part 1: Establishing Induction Relationships Using Ascending Dose Rifampin." *Clin Pharmacol Ther* 2018 Dec;104(6):1182-1190.
- Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM. "Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation." *Pharmacotherapy* 2001 Jul;21(7):778-96.
- Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, Verweij J, Sparreboom A, McLeod HL. "Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics." *Clin Cancer Res* 2003 Aug 15;9(9):3246-53.
- Miller DS, Bauer B ja Hartz AM. "Modulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve CNS Pharmacotherapy." *Pharmacol rev* 60.2 (2008): 196–209.
- Morita N, Yasumori T, Nakayama K. "Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities." *Biochem Pharmacol* 2003 Jun 1;65(11):1843-52.
- Mukonzo JK, Waako P, Ogwal-Okeng J, Gustafsson LL, Aklillu E. "Genetic variations in ABCB1 and CYP3A5 as well as sex influence quinine disposition among Ugandans." *Ther Drug Monit* 2010 Jun;32(3):346-52.
- Nakamura Y, Ikeda S, Furukawa T, Sumizawa T, Tani A, Akiyama S, Nagata Y. "Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole." *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jun 27;235(3):849-53.
- Narayan S, Sinsheimer JS, Paul KC, Liew Z, Cockburn M, Bronstein JM, Ritz B. "Genetic variability in ABCB1, occupational pesticide exposure, and Parkinson's disease." *Environ Res* 2015 Nov;143(Pt A):98-106.
- NCBI geenitietokanta – NCBI Gene, geenin tunnusnumero 5243, tietokanta päivitetty 16.3.2021. Saatavilla Internetistä osoitteessa www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
- Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. "Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data." *Bioinformatics* 2014 Mar 15;30(6):884-6.
- Orsini A, Esposito M, Perna D, Bonuccelli A, Peroni D, Striano P. "Personalized medicine in epilepsy patients." *J Transl Genet Genom* 2018;2:16.
- Pasquier J, Rioult D, Abu-Kaoud N, Marie S, Rafii A, Guerrouahen BS, Le Foll F. "P-glycoprotein-activity measurements in multidrug resistant cell lines: single-cell versus single-well population fluorescence methods." *Biomed Res Int* 2013;2013:676845.

Perrotton T, Tromprier D, Chang XB, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H. "(R)- and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1." *J Biol Chem* 2007 Oct 26;282(43):31542-8.

Pleban K, Kopp S, Csaszar E, Peer M, Hrebicek T, Rizzi A, Ecker GF, Chiba P. "P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach." *Mol Pharmacol* 2005 Feb;67(2):365-74.

Rafiee R, Chauhan L, Alonzo TA, Wang YC, Elmasry A, Loken MR, Pollard J, Aplenc R, Raimondi S, Hirsch BA, Bernstein ID, Gamis AS, Meshinchi S, Lamba JK. "ABCB1 SNP predicts outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with Gemtuzumab ozogamicin: a report from Children's Oncology Group AAML0531 Trial." *Blood Cancer J* 2019 May 21;9(6):51.

Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V. "Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines." *Nature* 1985 Aug 29-Sep 4;316(6031):817-9.

Robillard KR, Chan GN, Zhang G, la Porte C, Cameron W, Bendayan R. "Role of P-glycoprotein in the distribution of the HIV protease inhibitor atazanavir in the brain and male genital tract." *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(3):1713-22.

Rodríguez-Castillo JA, Arce-Mendoza AY, Quintanilla-Siller A, Rendon A, Salinas-Carmona MC, ja Rosas-Taraco AG. "Possible Association of Rare Polymorphism in the ABCB1 Gene With Rifampin and Ethambutol Drug-resistant Tuberculosis." *Tuberculosis* 95, no. 5 (2015): 532-537.

Sadeque AJ, Wandel C, He H, Shah S, Wood AJ. "Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition." *Clin Pharmacol Ther* 2000 Sep;68(3):231-7.

Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M, Ishikawa T. "Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1)." *Biochemistry* 2007 Jul 3;46(26):7678-93.

Schinkel AH ja Jonker JW. "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." *Adv Drug Deliv Rev* 2003 Jan 21;55(1):3-29.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJM ja Borst P. "Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." *Cell* 1994 May 20;77(4):491-502.

Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. "Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." *J Clin Invest* 1995 Oct;96(4):1698-705.

Sharom, FJ "Complex Interplay Between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function." *Front oncol* 4 (2014): 41–41.

Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM. "Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification." *Science* 232, no. 47 μ (1986): 643–645.

Shukla S, Schwartz C, Kapoor K, Kouanda A, Ambudkar SV. "Use of baculovirus BacMam vectors for expression of ABC drug transporters in mammalian cells." *Drug Metab Dispos* 2012 Feb;40(2):304-12.

Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, van Tellingen O. "Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):2031-5.

Stillemans G, Djokoto HP, Delongie KA, El-Hamdaoui H, Panin N, Haufroid V, Elens L. "Effect of four ABCB1 genetic polymorphisms on the accumulation of darunavir in HEK293 recombinant cell lines." *Sci Rep* 2021 Apr 26;11(1):9000.

Su L, Jenardhanan P, Mruk DD, Mathur PP, Cheng YH, Mok KW, Bonanomi M, Silvestrini B, Cheng CY. "Role of P-glycoprotein at the blood-testis barrier on adjuvin distribution in the testis: a revisit of recent data." *Adv Exp Med Biol* 2012;763:318-33.

Sugawara I, Hamada H, Tsuruo T, Mori S. "Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK 16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord." *Jpn J Cancer Res* 1990 Aug;81(8):727-30.

Swart M, Ren Y, Smith P, Dandara C. "ABCB1 4036A>G and 1236C>T Polymorphisms Affect Plasma Efavirenz Levels in South African HIV/AIDS Patients." *Front Genet* 2012 Nov 5;3:236.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7735-8.

Tulsyan S, Mittal R, ja Mittal B. "The Effect of ABCB1 Polymorphisms On the Outcome of Breast Cancer Treatment." *Pharmgenomics Pers Med*. 2016;9:47-58

Van Asperen J, van Tellingen O, Beijnen JH. "The role of *mdr1a* P-glycoprotein in the biliary and intestinal secretion of doxorubicin and vinblastine in mice." *Drug Metab Dispos* 2000 Mar;28(3):264-7.

Van Assema DM, Lubberink M, Rizzu P, Van Swieten JC, Schuit RC, Eriksson J, Scheltens P, Koepp M, Lammertsma AA, ja Van Berckel Bmm. "Blood–brain barrier P-glycoprotein function in healthy subjects and Alzheimer's disease patients: effect of polymorphisms in the ABCB1 gene." *EJNMMI Res* 2, 57 (2012).

Verschraagen M, Koks CH, Schellens JH, Beijnen JH. "P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: the case of digoxin-verapamil." *Pharmacol Res* 1999 Oct;40(4):301-6.

Vivona D, Lima LT, Rodrigues AC, Bueno CT, Alcantara GK, Barros LS, DE Moraes Hungria VT, Chiattoni CS, DE Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille M, Guerra-Shinohara EM. "ABCB1 haplotypes are associated with P-gp activity and affect a major molecular

response in chronic myeloid leukemia patients treated with a standard dose of imatinib.” *Oncol Lett* 2014 Apr;7(4):1313-1319.

Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ. “Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy.” *Mol Carcinog* 1995 Jul;13(3):129-34.

Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. “Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability.” *Pharmacogenet Genomics* 2005 Oct;15(10):693-704.

Wolf SJ, Bachtar M, Wang J, Sim TS, Chong SS, Lee CG. “An update on ABCB1 pharmacogenetics: insights from a 3D model into the location and evolutionary conservation of residues corresponding to SNPs associated with drug pharmacokinetics.” *Pharmacogenomics J* 2011 Oct;11(5):315-25

Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. “Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature.” *Clin Pharmacokinet* 2015 Jul;54(7):709-35.

Woodahl EL, Yang Z, Bui T, Shen DD, Ho RJ. “Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein.” *J Pharmacol Exp Ther* 2004 Sep;310(3):1199-207.

Wright GEB, Carleton B, Hayden MR, Ross CJD. “The global spectrum of protein-coding pharmacogenomic diversity.” *Pharmacogenomics J* 2018 Jan;18(1):187-195.

Yee SW, Brackman DJ, Ennis EA, Sugiyama Y, Kamdem LK, Blanchard R, Galetin A, Zhang L, Giacomini KM. “Influence of Transporter Polymorphisms on Drug Disposition and Response: A Perspective From the International Transporter Consortium.” *Clin Pharmacol Ther* 2018 Nov;104(5):803-817.

Yi SY, Hong KS, Lim HS, Chung JY, Oh DS, Kim JR, Jung HR, Cho JY, Yu KS, Jang IJ ja Shin SG “A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition.” *Clin Pharmacol Ther* 76: 418-427 (2004)

Yin, Beibei, Ping Lu, Jing Liang, Wei Zhang, Meng Xin, Ke Pei, ja Yan Li. "The ABCB1 3435C > T Polymorphism Influences Docetaxel Transportation in Ovarian Cancer." *Journal of International Medical Research* 47, no. 10 (2019): 5256-5269.

Zheng Q, Wu H, Yu Q, Kim DH, Lipton JH, Angelini S, Soverini S, Vivona D, Takahashi N, Cao J. “ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis.” *Pharmacogenomics J* 2015 Apr;15(2):127-34.

Zhong X, Liu MY, Sun XH, Wei MJ. “Association between ABCB1 polymorphisms and haplotypes and Alzheimer's disease: a meta-analysis.” *Sci Rep* 2016 Sep 7;6:32708.

Zschiedrich K, König IR, Brüggemann N, Kock N, Kasten M, Leenders KL, Kostić V, Vieregge P, Ziegler A, Klein C ja Lohmann K. “MDR1 Variants and Risk of Parkinson Disease: Association with Pesticide Exposure?” *J Neurol* 256.1 (2009): 115–120.

Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Koller D, Ovejero-Benito MC, Wojnicz A, Abad-Santos F. “How to make P-glycoprotein (ABCB1, MDR1) harbor mutations and measure its expression and activity in cell cultures?” *Pharmacogenomics* 2018 Nov;19(16):1285-1297.